



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS)

Departamento de Biotecnología

*Reporte de Especialización en Biotecnología
correspondiente al trabajo:*

*Procesos de fermentación sólida en un sistema modular de
reactores tubulares*

Asesores:

- Dr. Sergio Huerta Ochoa

- Dr. Ernesto Favela Torres

- Dr. Felipe López Isunza

Alumno:

I.B.Q Medina Moreno Sergio A.

1993

INDICE

INTRODUCCION	i
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	1
1.1 El proceso de Fermentación en Medio Sólido(FMS)	1
1.2 Fermentadores empleados para los procesos de FMS	5
1.3 Principales parámetros en el proceso de FMS	7
1.4 El escalamiento en la FMS	11
1.5 Metabolitos	12
1.5.1 Fenol-oxidasa	12
1.5.2 Conidiosporas	14
1.5.3 Mananasas	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo General	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Sistema modular de reactores y equipo periférico	18
4.1.2 Esterilización	22
4.2 Producción de fenol-oxidasa	23
4.2.1 Microorganismo, soporte y medio de cultivo	23
4.2.2 Inóculo, configuraciones y condiciones de la fermentación	23
4.3 Producción de Conidiosporas	26
4.3.1 Microorganismo, soporte y medio de cultivo	26
4.3.2 Inóculo, configuraciones y condiciones de la fermentación	26
4.4 Producción de mananasas	29
4.4.1 Microorganismo, soporte y medio de cultivo	29
4.4.2 Inóculo, configuraciones y condiciones de la fermentación	29

4.5 Determinación de las cinéticas de gases y temperatura	32
4.5.1 Gases	32
4.5.2 Temperatura	33
4.6 Muestreo del material fermentado y técnicas analíticas	36
4.6.1 Muestreo	37
4.6.2 pH	39
4.6.3 Porcentaje de Humedad	40
4.6.4 Actividad de agua (Aw)	41
4.6.5 Inóculo - cuantificación de esporas	42
4.6.6 Actividades enzimáticas y proteína	44
4.6.5 Determinación del número de Reynolds (Re)	49
5. RESULTADOS Y DISCUSION	55
5.1 Cinéticas	55
5.1.1 Cinéticas de Temperatura	55
5.1.2 Cinéticas de Gases	64
5.2 Perfiles axiales	85
5.2.1 Perfiles axiales en la producción de fenol-oxidasa	85
5.2.2 Perfiles axiales en la producción de conidiosporas	90
5.2.3 Perfiles axiales en la producción de mananasas	93
5.3 Efecto del Reynolds en la producción de los metabolitos	96
6. CONCLUSIONES	102
7. REFERENCIAS	103

INTRODUCCIÓN

El presente documento engloba el trabajo realizado para la caracterización de un sistema modular de reactores tubulares en procesos de fermentación en estado sólido (FMS). Para hacer esto se emplearon diferentes geometrías del sistema modular de reactores, en los cuales se llevó a cabo la producción de tres diferentes metabolitos: las enzimas extracelulares fenol-oxidasa (a partir del actinomiceto *Streptomyces cyaneus*) y mananasas (a partir del hongo filamentosos *Aspergillus oryzae*), así como un bioinsectisida (las conidiosporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*).

La estructura del reporte es como sigue: en el *capítulo 1* se da una revisión bibliográfica, en la cual se mencionan aspectos referentes a la FMS tales como sus principales parámetros, así como los reactores usados para este proceso. También se da una revisión en lo que se refiere a los metabolitos producidos durante el trabajo experimental.

Los capítulos 2 y 3 tocan respectivamente, lo que concierne a la justificación y objetivos planteados para el presente trabajo. El *capítulo 4* trata de los materiales y métodos ocupados. En este capítulo se da una descripción detallada del sistema modular de reactores y su equipo periférico, mostrándose esquemas y fotografías de los mismos. También se describe de que manera fueron llevadas a cabo cada una de las fermentaciones, la toma de muestras en el material fermentado y la medición de las principales variables en los procesos.

En lo que respecta al *capítulo 5*, se cubren los resultados y discusión referentes a la producción de los metabolitos en el sistema modular de reactores tubulares. En este capítulo se hace el análisis de cinéticas de temperatura y gases (CO_2 y O_2), así como de perfiles axiales en variables como pH, humedad,

actividad de agua, actividad enzimática etc., Finalmente se discute el efecto del número de Reynolds durante la producción de los metabolitos.

En el *capítulo 6* se dan las conclusiones del trabajo, mientras que el *capítulo 7* muestra las referencias en que se apoyó la realización del reporte.

Finalmente me gustaría agradecer a varias personas por su apoyo y paciencia durante el desarrollo de la parte experimental como en la escritura de este documento: a los doctores Sergio Huerta Ochoa y Ernesto Favela Torres por haber soportado las “n” revisiones del reporte, así como a sus valiosas sugerencias. A todos mis compañeros de trabajo de la PP4, principalmente a Lisbeth Cantú, Juan Romano, Rosario Peralta y Alejandro Tellez. Por último a mi esposa Angie, quién siempre me alentó y confió en la finalización de este trabajo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

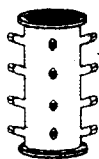
1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1 El proceso de Fermentación en Medio Sólido (FMS)

Los cultivos en medio sumergido han sido estudiados ampliamente, por lo que se conocen muy bien los aspectos fisiológicos, bioquímicos y de ingeniería de dichos procesos. Sin embargo, el exceso de agua empleado ha originado problemas tales como (Mudgett, 1986):

- i)** Generación de grandes volúmenes de operación, con las dificultades asociadas a la disponibilidad de espacio
- ii)** Obtención de productos altamente diluidos; con lo que los costos en los procesos de purificación han alcanzado un alto porcentaje del proceso total.
- iii)** La instalación de plantas de tratamiento de aguas; necesarias para limpiar los efluentes originados por este tipo de procesos.
- iv)** Dificultades en los transportes de masa y calor, debido a problemas reológicos por la generación de biomasa y productos.
- v)** En el caso de procesos aeróbicos, altos costos debido a la energía empleada para la agitación y aireación.

Uno de los procesos alternativos, que permiten eliminar algunos de los problemas inherentes al cultivo sumergido, son las *Fermentaciones en Medio Sólido (FMS)*. La principal distinción entre la fermentación en medio sólido y la de cultivo sumergido, se basa en el hecho de que en el primero el crecimiento microbiano y la formación de productos ocurren sobre la superficie de un material sólido con un bajo contenido de

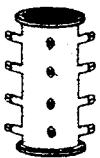


agua, mientras que en el segundo el crecimiento y la formación de productos ocurren en una fase líquida.

Las FMS son procesos que se desarrollan, en su mayoría, en presencia de oxígeno en forma gaseosa. Los microorganismos que se utilizan en las FMS son principalmente los hongos filamentosos ya que reúnen características que no tienen otra clase de microorganismos y mejoran la eficiencia del proceso. Entre las características de los hongos filamentosos con respecto a otros microorganismos tenemos:

- a) Muchos de los hongos filamentosos, pueden crecer con actividades de agua desde 0.98 hasta 0.999.
- b) La velocidad y manera en que colonizan las superficies sólidas, son mucho más eficientes.
- c) En general, poseen una alta capacidad en la transformación de los substratos, y por lo tanto generan una gran diversidad de productos.
- d) La facilidad para conservar y manejar las cepas en su forma esporulada.

En forma más precisa, la FMS puede ser vista como un proceso con microorganismos en un sistema heterogéneo gas-líquido-sólido, en el cual una fase acuosa está íntimamente asociada con una superficie sólida y también está en contacto con una fase gaseosa continua. Dependiendo del contenido de humedad en el sólido una parte del agua está ligada a la superficie sólida y otra se encuentra en forma libre en las regiones capilares del sólido. La interfase aire-agua, permite el intercambio gaseoso oxígeno-dióxido de carbono, así como la transferencia de calor. La fase sólida funciona como un soporte de los microorganismos, y puede proporcionar una fuente rica y



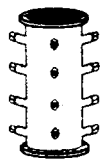
compleja de nutrientes, los cuales pueden ser completos o incompletos con respecto a los requerimientos nutricionales del microorganismo a ser cultivado, y en donde la composición química del sólido puede ser determinada mediante un análisis aproximado en términos de proteína, carbohidratos y lípidos. Los substratos tradicionalmente fermentados en el estado sólido incluyen una variedad de productos agrícolas, tales como arroz, trigo, mijo, maíz y cebada; sin embargo también han sido empleados soportes sólidos que no son substratos, como la resina de intercambio iónico Amberlita IRA 900 (Auria, 1993),

Aunque los sólidos empleados como substrato, por lo general contengan fuentes de carbono de bajo peso molecular, la mayoría del peso seco está formado por complejos poliméricos que requieren de una hidrólisis para su uso como fuente de carbono y energía para el metabolismo microbiano, en comparación con el cultivo sumergido el cual emplea fuentes de carbono y energía menos complejas, pues cuando emplea substratos de alto peso molecular, estos pueden originar problemas de viscosidad en el medio, así como inducción, inhibición u otros mecanismos de represión en el metabolismo microbiano.

Algunas de las principales características y ventajas de los procesos de FMS son (Hesseltine, 1972):

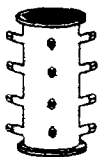
- i)* El substrato sólido puede requerir solo la adición de agua; también pueden ser adicionados otros nutrientes.

- ii)* Los recipientes de fermentación pueden ser relativamente pequeños en base al rendimiento del producto, empleándose pequeñas cantidades de agua y teniendo por lo tanto el substrato en forma concentrada.



- iii)* Los bajos contenidos de humedad reducen los problemas de contaminación.
- iv)* Las condiciones para el crecimiento de microorganismos filamentosos son similares a las de su hábitat natural.
- v)* La aireación es facilitada por el espacio entre las partículas.
- vi)* El rendimiento del producto/sustrato ($Y_{p/s}$) generalmente es más alto que en el caso del cultivo sumergido, reproducido bajo condiciones similares.
- vii)* Los sólidos fermentados pueden ser extraídos inmediatamente por la adición directa de solventes o mantenerse adecuadamente almacenado para su posterior extracción.
- viii)* Los productos pueden ser incorporados directamente en la dieta de animales.

Aunque países del Oriente como Japón, han empleado en forma empírica procesos de fermentación sólida para la producción de metabolitos antes del empleo del cultivo sumergido (Mudgett, 1986), existen pocos trabajos referentes al comportamiento de un sistema de fermentación sólida consistente en la determinación de las variables significativas del proceso (pH, humedad y temperatura) así como de cinéticas y efectos de la aireación basándose en el crecimiento y síntesis de productos.

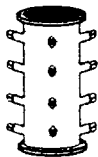


1.2 Fermentadores empleados para los procesos de FMS

Hasta este momento, ha sido desarrollada una gran variedad de reactores o fermentadores para los procesos de FMS. Los fermentadores diseñados y empleados con este propósito, pueden ser ubicados en seis tipos (Lonsane, 1986):

1) Fermentadores de tambor rotatorio: El diseño esta basado en el uso de contenedores en forma de tambor, montados en un sistema de rodillos que actúan como soporte y sistema de rotación, en forma alternativa un mecanismo de tiempo puede ser usado para la rotación del tambor. Las velocidades de rotación varían de 1 a 180 rev/min (Hasseltine, 1972). Los tambores empleados en diferentes trabajos, incluyen contenedores de vidrio Pyrex de 5 L, hasta contenedores de acero inoxidable de 114 L, generalmente equipados con una entrada y salida de aire. Los procesos de limpieza y esterilización, son realizados *in situ* y su principal desventaja se ha presentado al tratar de ser escalados, pues a medida que su tamaño aumenta, se observa una destrucción en el micelio (Schulze, 1962).

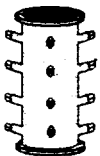
2) Fermentadores de envase cubierto: Este tipo de fermentadores ha sido desarrollado principalmente para trabajos de escalamiento a nivel piloto y consisten de reactores con relaciones L/D (longitud/diámetro) menores a 0.6, equipados con un sistema de aireación bajo presión, con la desventaja de una fácil reversión en la dirección del flujo de aire, y por lo tanto problemas en el control de temperatura. Varias operaciones tales como humidificación, esterilización, inoculación e incubación, son llevadas *in situ*. Sus principales ventajas son: bajos requerimientos de espacio, un crecimiento micelar uniforme, rendimientos altos y consistentes, y la eliminación de mecanismos de rotación, sin embargo estos fermentadores no están disponibles para operaciones en gran escala.



3) Celdas de incubación vertical e inclinada: Estos fermentadores, consisten de celdas de incubación cúbicas verticales e inclinadas, de vidrio y acero inoxidable con aireación forzada. Han sido usados en forma satisfactoria para trabajos de FMS en pequeña escala. Sin embargo sistemas de este tipo han demostrado una alta ineficiencia al ser ocupadas en mayor escala.

4) Fermentadores de bandeja: Este tipo de sistemas consiste de bandejas, en las cuales el soporte-substrato, previamente inoculado es distribuido sobre la superficie de éstas hasta formar capas con un espesor de 1 a 2 pulgadas. Estas bandejas son colocadas en gabinetes donde las condiciones óptimas para el crecimiento (humedad y temperatura), son controladas obteniéndose altos rendimientos, las bandejas poseen por lo general bases metálicas perforadas, con la finalidad de permitir la correcta aireación del material a fermentar. Algunos fermentadores han sido ocupados para escalamiento en plantas a nivel piloto y plantas semicomerciales, sin embargo estos sistemas presentan una gran desventaja para su uso en gran escala, la cual es la necesidad de una gran mano de obra para su operación.

5) Fermentadores en columna: Estos consisten de envases cilíndricos de vidrio o acero, provistos con entradas en la parte inferior y salida en la parte superior para la aireación, mientras que la temperatura es controlada colocando las columnas en cuartos a temperatura controlada o pasando agua a temperatura controlada mediante chaquetas alrededor de la columna (Silman, 1979). La humedad dentro de la columna puede ser controlada mediante pulsos de aire seco y saturado. Estos sistemas han sido empleados en pequeña escala, ofreciendo serios problemas para su escalamiento.



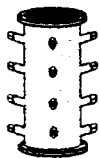
6) Miscelánea de Fermentadores: Una gran variedad de diseños y tamaños, ha sido empleada para trabajos en laboratorio, escalamiento y la medición de ciertos parámetros. Cabe señalar que todos estos se han utilizado solamente a pequeña escala.

1.3 Principales parámetros en el proceso de FMS.

Es esencial el monitoreo y control de varios parámetros para la adecuada utilización de la FMS. Los principales parámetros de este proceso y algunas de sus características e importancia se indican a continuación.

Humedad

El nivel de humedad del sustrato es uno de los factores clave que influyen en el proceso de FMS, el cual es gobernado por la naturaleza del sustrato, tipo de producto final y el requerimiento del microorganismo. Su importancia para la producción de aflotoxinas, enzimas y descomposición lignocelulolítica es bien conocida (Nishio, 1979). Un alto nivel en la humedad resulta en un decaimiento de la porosidad, baja difusión del oxígeno, un alto incremento en la posibilidad de contaminación con bacterias, y reducción en el intercambio de gases. El contenido inicial de humedad recomendado se encuentra en un intervalo del 60-75%, sin embargo esta humedad inicial puede disminuir durante el curso de la fermentación debido a la evaporación y la actividad metabólica; esta pérdida puede ser compensada teniendo una atmósfera con una humedad relativa del 90-97%, o haciendo pasar a través del material a fermentar aire saturado a la temperatura de fermentación.



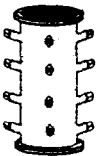
Temperatura

Una gran cantidad de calor se produce durante los procesos de FMS (3750 kcal/ kg materia seca; Edwards, 1977) y éste es directamente relacionado a la actividad metabólica del microorganismo (Chahal, 1983). El calor generado debe ser disipado lo más rápidamente posible, pues este tiene un efecto directo sobre el crecimiento, formación del producto y esporulación.

En sistemas de composteo en los que no se disipa el calor, y en los que se empieza con temperaturas de 37°C, se alcanzan hasta 65-80°C (Hayes, 1977). Se han empleado diferentes métodos para poder disipar el calor generado en los procesos de FMS y poder mantenerlos en forma isotérmica, algunos de estos son: *i)*forzar el paso de aire a través del reactor, *ii)*colocar el reactor en cuartos con temperatura controlada, *iii)*circular agua a temperatura controlada alrededor del reactor mediante chaquetas (Silman, 1979), y *iv)*sumergir el fermentador en baños de agua con temperatura controlada.

pH

También el pH es uno de los factores críticos para el monitoreo y control de la FMS. Una buena capacidad de amortiguamiento de algunos de los substratos empleados en la FMS ayuda a eliminar la necesidad de controlar esta variable (Chahal, 1983). Debido a que los principales microorganismo usados en este tipo de proceso, son los hongos filamentosos cuya actividad metabólica se optimiza a pH ácidos, el intervalo de pH en que se trabaja varía de 4-5 (Tauro, 1976). Aunque al principio de la fermentación, el pH sea ajustado dentro del intervalo recomendado, la actividad microbiana por lo general tiende a modificar el nivel de pH durante el proceso (Knapp, 1980) provocando



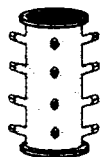
una baja en la eficiencia para la producción del metabolito deseado, por lo que el control de este parámetro es de suma importancia.

Aireación y transferencia de O₂

La aireación del material a fermentar en muchos laboratorios con fermentadores a mediana y gran escala se lleva a cabo mediante aireación forzada. Las velocidades de aireación están gobernadas por la naturaleza del microorganismo empleado, el grado de O₂ requerido para la síntesis del producto, la cantidad de calor metabólico a disipar, el grado en el cual el CO₂ y otros metabolitos volátiles serán removidos, y el número de espacios disponibles en el sustrato (Chahal, 1983). Por ejemplo, una alta tasa de aireación es esencial para incrementar la producción de aflotoxinas, β galactosidasa e invertasa (Silman, 1979 y 1980; Chahal, 1983), sin embargo, ésta inhibe la producción de ocratoxinas (Lindenfeiser, 1975).

Un completo cambio de la atmósfera gaseosa a intervalos o el cambio en la dirección del flujo de aire son los principales métodos empleados para controlar la fase gaseosa. La pérdida de la humedad en el soporte sólido, ha sido un problema asociado al empleo de altas tasas de aireación, lo que se ha resuelto empleando humidificadores para el aire de entrada a los fermentadores.

Con respecto a la determinación en línea del CO₂ y O₂ en los procesos de fermentación en estado sólido, se han reportado trabajos en los cuales a la salida del fermentador estos gases son monitoreados mediante cromatografía de gases (Saucedo, 1994). Este tipo de monitoreos provee información acerca de las diferentes etapas fisiológicas, tasas respiratorias del cultivo y determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ).

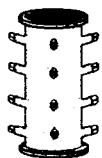


Crecimiento

Las secuencias de crecimiento en la FMS bajo condiciones óptimas cuando se ha inoculado con esporas, envuelve a las etapas normales que son: adaptación, germinación, crecimiento, fase estacionaria y esporulación. La complejidad presentada por los sistemas de fermentación sólida para la determinación de la biomasa, debido a su gran heterogeneidad y asociación de la biomasa al soporte, han impulsado a un gran grupo de investigadores a intentar determinarla mediante ingeniosos métodos. En forma algo reciente, se ha intentado la determinación en línea de la biomasa (Auria, 1993) mediante la correlación en la caída de presión (ΔP) a través del lecho durante una fermentación con aireación, y así determinar cambios macroscópicos en forma cualitativa y en algunas veces cuantitativa en estos sistemas. Un incremento en el ΔP fue correlacionado con diferentes fases de crecimiento (germinación, crecimiento vegetativo, limitación y esporulación) de *Aspergillus niger* todas observadas al microscopio durante la fermentación y manteniendo constante la humedad. En este experimento en el cual se empleó Amberlita IRA-900, la permeabilidad de la fase gaseosa del lecho fue relacionada directamente al contenido de biomasa.

Tamaño de partícula

Un tamaño de partícula adecuado, provee un área superficial para la transferencia de calor y el intercambio gaseoso, proporcionando a su vez una gran porosidad y una mejor distribución de la humedad y nutrientes, es decir vuelve al sistema menos heterogéneo. No solamente es importante considerar el tamaño de partícula, sino también la geometría de ésta, pues resulta de vital importancia para la difusión de nutrientes esenciales para el crecimiento.



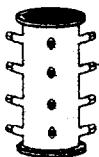
1.4 El escalamiento en la FMS

Debido a que en los procesos de FMS no se han reportado fermentadores comerciales, tanto el diseño como las estrategias para su escalamiento no han sido abordados con la profundidad deseada. La eficiencia de los procesos de FMS depende directamente del diseño de los biorreactores, el cual a su vez está condicionado por:

- i)* Si el proceso requiere o no de mezclado.
- ii)* La tasa de aireación.
- iii)* La eficiencia en la disipación del calor.
- iv)* La medición y control de los parámetros del proceso.
- v)* El tipo de soporte a emplear.
- vi)* La estrategia de esterilización.
- vii)* El régimen de operación, es decir por lotes o continuo.
- viii)* Inversión y costos de operación.
- ix)* Los criterios de escalamiento a utilizar.

Las razones por las que los reactores para Fermentación en Medio Sólido en Occidente no han sido considerados en escala industrial son dos: 1) Esta es de tipo comercial, y se debe a que los reactores líquidos se diseñaron hace más de 50 años, y desde entonces han sido comercializados con éxito, 2) no existe un prototipo generalizado único como en el caso de los reactores agitados en cultivo sumergido.

El escalamiento de bioreactores se define como un conjunto de técnicas y procedimientos que permiten diseñar un equipo en una mayor escala, partiendo de los resultados de un equipo de escala menor. El éxito del escalamiento depende siempre del manejo y la conservación de ciertos criterios que predominan en los equipos de las dos escalas. De esta manera, al observar y estudiar el efecto que juegan diferentes



configuraciones de un sistema de reactores modulares sobre los diferentes parámetros de la FMS, se tendrá bases más firmes para estudios de escalamiento.

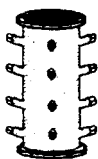
1.5 Metabolitos

Una gran variedad de productos derivados del metabolismo (metabolitos) se pueden obtener en los procesos de fermentación sólida. Entre estos tenemos: enzimas, esporas, metabolitos primarios (asociados al crecimiento, como el ácido cítrico), metabolitos secundarios (no asociados al crecimiento, como los antibióticos) etc. Durante el presente proyecto se llevo a cabo la producción de tres diferentes metabolitos, de los cuales se da un breve antecedente.

1.5.1 Fenol-oxidasa

Los tratamientos con microorganismos de materiales lignocelulolíticos han recibido una gran atención durante los últimos años, especialmente por 2 razones: 1) La capacidad que tienen ciertos microorganismos de liberar celulosa, hemicelulosa y glucosa de los materiales lignocelulolíticos, permitiendo su uso como alimento para animales rumiantes (Reid, 1989), 2) La capacidad que tienen estos mismos microorganismos de poder hidrolizar y actuar sobre los componentes de la lignina (llamado proceso de *delignificación*). Este segundo punto ha resultado de gran utilidad, pues se han podido llevar a cabo procesos de biopulpeo, evitando así los altos costos de energía y tratamiento de aguas en los métodos mecánico y químico de pulpeo (Masood, 1993).

Los tres principales monómeros de la lignina sobre los que actúan los microorganismos en el proceso de delignificación, son los fenoles que se muestran en la *Fig. 1.5.1*.



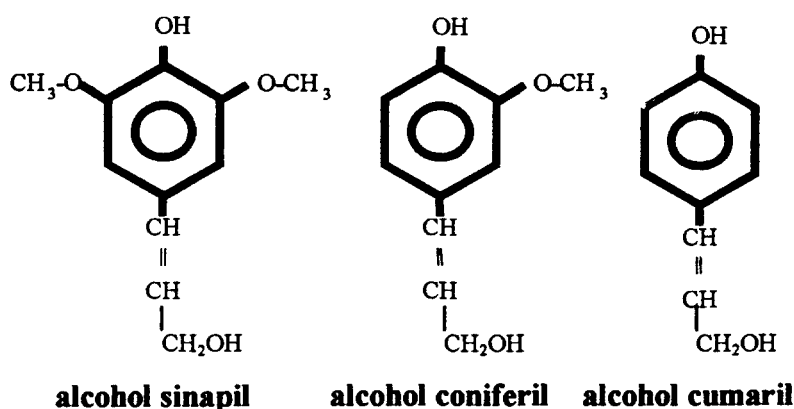
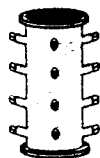


Fig 1.5.1. Componentes de la lignina

Los microorganismos capaces de llevar a cabo el proceso de delignificación, son los hongos blancos de putrefacción con especies tales como *Phanerochaete tremellosa*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Dichomitus squalens*, *Hypodontia setulosa*, *Phlebia brevispora*, todos ellos clasificados dentro de los Basidiomicetos (Agosin, 1985; Masood, 1993). También se ha reportado el uso de bacterias pertenecientes a la familia de los Actinomicetos (bacterias filamentosas) tales como *Streptomyces cyaneus* (Berrocal, 1996). Las enzimas extracelulares producidas por estos microorganismos para la hidrólisis de la lignina, se denominan lignino-peroxidasas y actúan a nivel del polímero o directamente sobre los monómeros. Un ejemplo de este tipo de enzimas extracelulares, es la Fenol-oxidasa encargada de la delignificación en la paja de trigo (Berrocal, 1996).

Es de esta forma que el proceso de Fermentación en Medio Sólido, ha sido el método escogido para la producción de la fenol-oxidasa, por lo que estudios básicos para entender los requerimientos fisiológicos y el diseño de reactores para su producción deben ser desarrollados.



1.5.2 Conidiosporas

Los hongos entomopatógenos, son microorganismos cuyas esporas son capaces de infectar a un gran espectro de insectos en estado larvario, muchos de los cuales son plagas en un gran número de cultivos. Este hecho es de gran importancia, pues la producción de esporas de este tipo de hongos, permiten emplearlos como bioinsecticidas, evitando así el uso de químicos para la erradicación de plagas (Goettel, 1992)

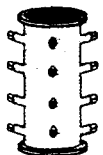
Uno de los principales hongos, cuyas esporas (conidiosporas) han sido empleadas como bioinsecticidas es *Beauveria bassiana* (Pereira, 1993; Miranpuri, 1993). Este es un hongo de crecimiento lento, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 29°C, siendo extremadamente sensible a cambios de temperatura.

La resistencia de las conidias frente a condiciones ambientales adversas representa una gran ventaja de *B. bassiana* sobre los biopesticidas convencionales debido a que produce efectos prolongados sobre las plagas de insectos (Goettel, 1991).

Se han reportado trabajos para la producción de este bioinsecticida, en forma de blastosporas en cultivo sumergido (Peczynska-Czoch, 1991), y conidiosporas en Fermentación en Medio Sólido (Desgranges, 1993).

1.5.3 Manananas

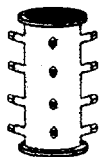
Dentro de los residuos agrícolas como la borra de café y pasta de copra, los tres mayores componentes que la integran son: celulosa (30-50%), hemicelulosa (20-40%, constituida por xylanos, xilenos y galactomananos) y lignina. El uso de este tipo de residuos lignocelulolíticos como una fuente de alimento y combustible, requiere la liberación de las hexosas y pentosas presentes, haciendo necesaria una eficiente



conversión enzimática de estos materiales para convertirlos en sus constituyentes estructurales más simples (Mandels, 1975).

Muchos microorganismos han sido estudiados, encontrando en ellos actividades de glucosidasas, xilanasas y mananasas. Dentro de los géneros más importantes tenemos: *Bacillus*, *Trichoderma*, *Tyromyces*, *Aspergillus* (Rättö, 1988). En muchos casos, éstos han sido cultivados en substratos puros en cultivo. Últimamente el proceso de fermentación en estado sólido ha sido más ampliamente estudiados para la producción de este tipo de enzimas (Toyama, 1976; Rao, 1983).

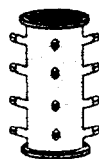
Dentro del conjunto de enzimas producidas al emplear como substrato los desechos agrícolas, encontramos las mananasas, a las que se les ha encontrado una gran aplicación en el tratamiento de la pulpa (hidrólisis de los galactomananos de la hemicelulosa, Rättö, 1988). Estas enzimas, son producidas por diferentes especies de hongos filamentosos pertenecientes al género de *Aspergillus* (Civas, 1984; Conrad, 1981; Deschamps, 1985).



JUSTIFICACIÓN

2.JUSTIFICACIÓN

Los altos costos inherentes a la tecnología y producción de metabolitos por medio del cultivo sumergido, así como la problemática asociada al tratamiento de los grandes volúmenes de sus efluentes, la hacen poco accesibles para países en desarrollo como México. Esto hace necesario la búsqueda de nuevas tecnologías para la obtención de los mismos productos. Una tecnología alterna al cultivo sumergido la encontramos en los procesos de cultivo sólido, específicamente en la Fermentación en Medio Sólido (FMS). Sin embargo en la actualidad además de existir una gran variedad de equipos para este tipo de proceso, no se le ha dado el mismo desarrollo que al cultivo sumergido. Por estas razones es fundamental disponer de un sistema que permita una mejor comprensión de la tecnología de FMS, proporcionando una base para su desarrollo a nivel piloto e industrial. Así en el presente proyecto de investigación, se llevó a cabo la caracterización de un sistema modular de reactores tubulares para la producción de diferentes metabolitos por medio de la FMS, tratando de contribuir de esta manera en el desarrollo tecnológico de este proceso.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterización de un sistema modular de reactores tubulares durante la producción de tres diferentes metabolitos, empleando para ello el proceso de fermentación en estado sólido (FMS).

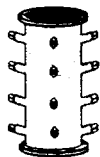
3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Producción de los metabolitos: fenol-oxidasa, mananasa y conidiosporas; empleando diferentes geometrías del sistema modular de reactores tubulares.

3.2.2 Determinación de la actividad microbiana, mediante cinéticas de gases (O_2 y CO_2) y temperatura para cada geometría.

3.2.3 Obtención de perfiles axiales de: humedad, pH, actividad de agua (a_w) y actividad enzimática, para cada una de las geometrías.

3.2.4 Evaluación del efecto del número de Reynolds (Re) en la producción de los diferentes metabolitos.



MATERIALES Y METODOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Sistema modular de reactores y equipo periférico.

Para la producción de cada uno de los metabolitos, se empleó un sistema modular de reactores integrado por las siguientes partes:

1) **Módulos Superiores:** Se emplearon módulos construidos de acero inoxidable de 1/8 de pulgada cédula 80. Los módulos tienen 30 cm de altura y dos diferentes diámetros, 10.8 y 21.6 cm (*Fig 4.1.1*). Cada módulo consta de 12 entradas distribuidas en 3 columnas, separadas por ángulos de 127° . Cada módulo lleva una tapa del mismo material correspondiente a cada diámetro. Los orificios de los tornillos para la colocación de las tapas, están separados uno de otro por ángulos de 40° . (*Fig 4.1.2 d*)

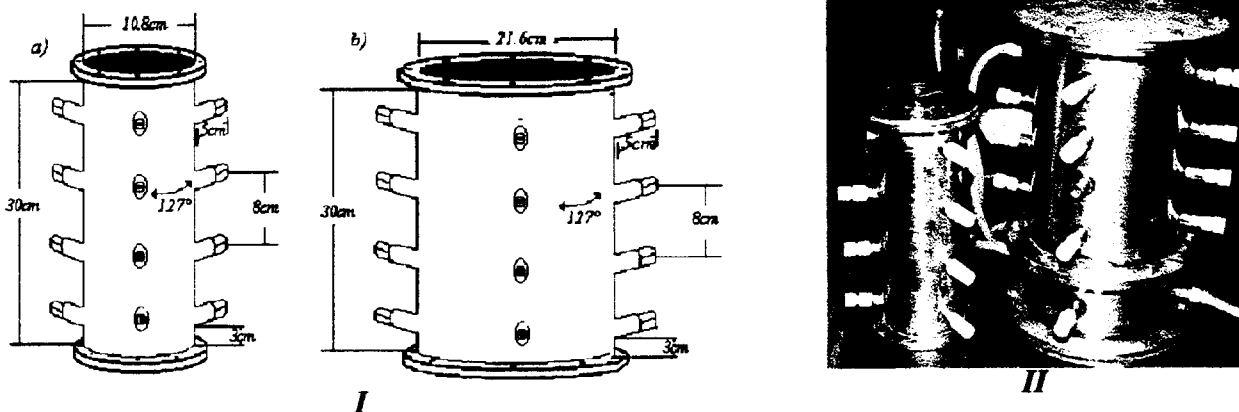
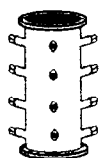


Fig.4.1.1. Módulos superiores del sistema de reactores: *I.* Componentes: a) Módulo con diámetro interno de 10.8cm, b) Módulo con diámetro interno de 21.6 cm. *II.* Vista de los módulos superiores.

2) **Módulos inferiores:** Se emplearon módulos inferiores construidos de acero inoxidable de 1/8 de pulgada cédula 80 con diámetros internos iguales a los módulos superiores. Cada módulo posee 4 orificios (o entradas), separados cada uno por ángulos de 90° (*Fig4.1.2*). Junto con los módulos inferiores, se emplearon tapas de distribución,



con 2 objetivos: servir como base para el material fermentado, y distribuir el aire de entrada al fermentador.

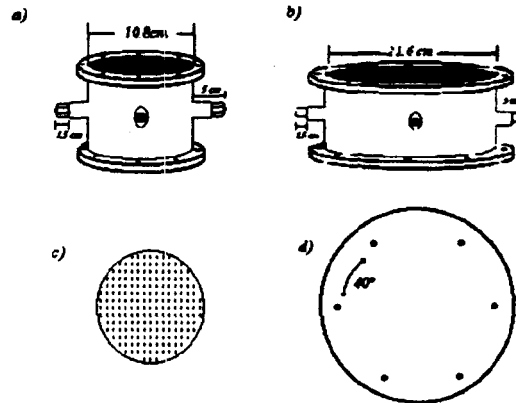
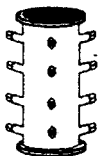


Fig. 4.1.2. Módulos inferiores: a) Módulo inferior de diámetro 10.8 cm, b) Módulo inferior de diámetro 21.6 cm, c) Tapa distribuidora, d) Distribución de los orificios para los tornillos de las tapas de los módulos superiores.

3) Cámara para el control de temperatura: Para el control de la temperatura alrededor del sistema modular de reactores, se utilizó una cámara la cual está formada por 3 caras de policarbonato, 2 de acrílico y 1 domo (o tapa). Las paredes de acrílico (paralelas y frontales entre sí) poseen una serie de orificios por donde se introducen las diferentes conexiones. En el interior de la cámara, se encuentra un sistema de tubería de PVC para distribuir el aire de calentamiento (*Fig. 4.1.3*).

4) Sistema de calentamiento de la cámara: El sistema de calentamiento empleado para la recirculación del aire, consta de un turbo ventilador de 1/4 HP de potencia (*Fig. 4.1.4*). Este a su vez posee una resistencia conectada directamente a un Reostato. El turboventilador y el reostato están conectados a un control de encendido-apagado (on-off).



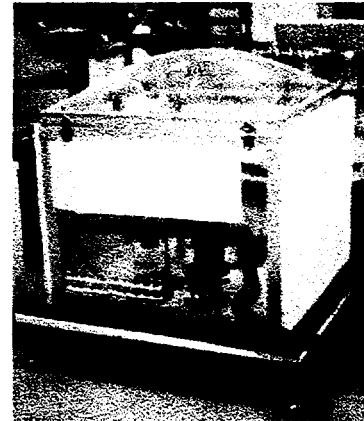
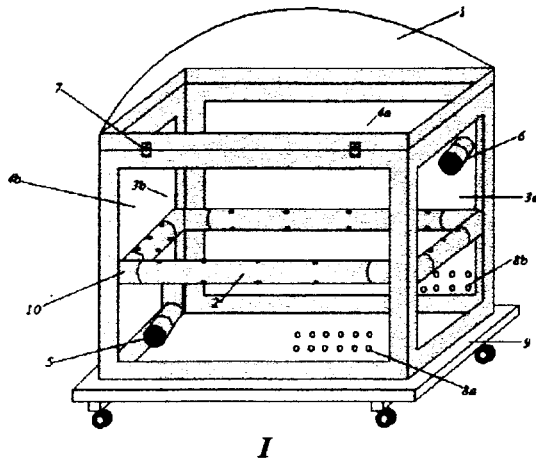


Fig. 4.1.3. Cámara para el control de temperatura. *I.* Componentes: 1)Domo; 2)Sistema de tubería (PVC); 3a,3b) Paredes de vidrio; 4a, 4b)Paredes de policarbonato; 5)Entrada del aire de calentamiento; 6)Salida del aire de calentamiento; 7)Seguros; 8a,8b)Orificios para conexiones; 9)Mesa de transporte; 10)Codos de unión de la tubería. *II.* Vista de la cámara de calentamiento.

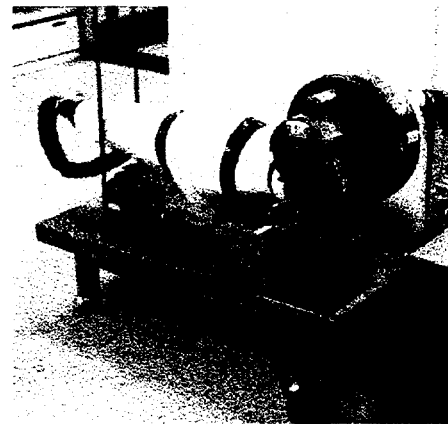
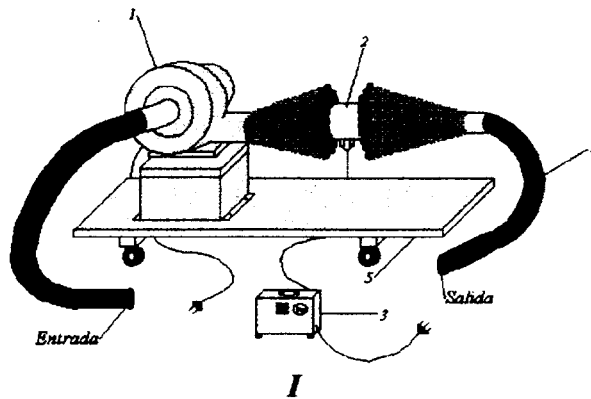
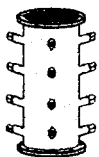


Fig. 4.1.4. Sistema de calentamiento de la cámara. *I.* Componentes: 1) Turbo ventilador; 2) Resistencia; 3) Reostato; 4) Mangueras de conducción del aire; 5) Mesa de transporte. *II.* Vista lateral del sistema de calentamiento



5) **Humidificadores:** Los humidificadores se emplearon con la finalidad de evitar el secado del material a fermentar, mediante el control de la humedad del aire a la entrada de los reactores, saturándolo a la temperatura en que se corrió cada fermentación. Se emplearon humidificadores externos (prehumificadores, los cuales se encontraron fuera de la cámara de control de temperatura) e internos (humidificadores que se mantuvieron dentro de la cámara de control de temperatura) para cada una de las configuraciones en el sistema modular de reactores (*Fig. 4.1.5*).

6) **Baño de temperatura:** La finalidad del baño fue mantener la temperatura del agua de los humidificadores a la misma en que se llevaron cada una de las fermentaciones, para no crear gradientes internos de temperatura y evitar el secado o inundamiento del material a fermentar. Este consistió de un baño maría con control de temperatura marca Grant.

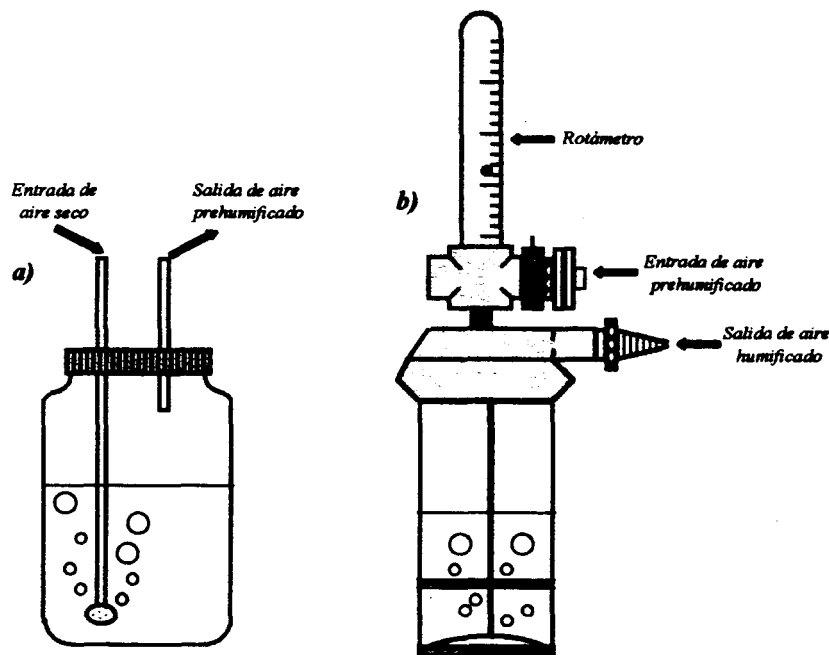
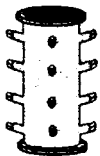


Fig 4.1.5. Humidificadores. a) Humidificadores externos o prehumificadores, b) Humidificadores internos



4.1.2 Esterilización

El sistema modular de reactores, junto con sus accesorios (mangueras, humidificadores, filtros de aire y conexiones), se esterilizaron para los procesos de producción de fenol-oxidasa y conidiosporas. Los módulos superiores e inferiores, fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 min empleando para esto bolsas de plástico resistentes al calor. Los accesorios fueron esterilizados manteniéndose en una solución de fenol al 2%, 48 horas antes de ser usados y poniéndose a secar en campana de flujo laminar 2 horas previas al empaque y armado del sistema modular de reactores.

En la línea de alimentación del aire de proceso, se colocaron filtros rellenos de lana de vidrio, totalmente herméticos (*Fig 4.1.6*). El agua empleada en los humidificadores, también fue esterilizada a 120°C durante 15 min.

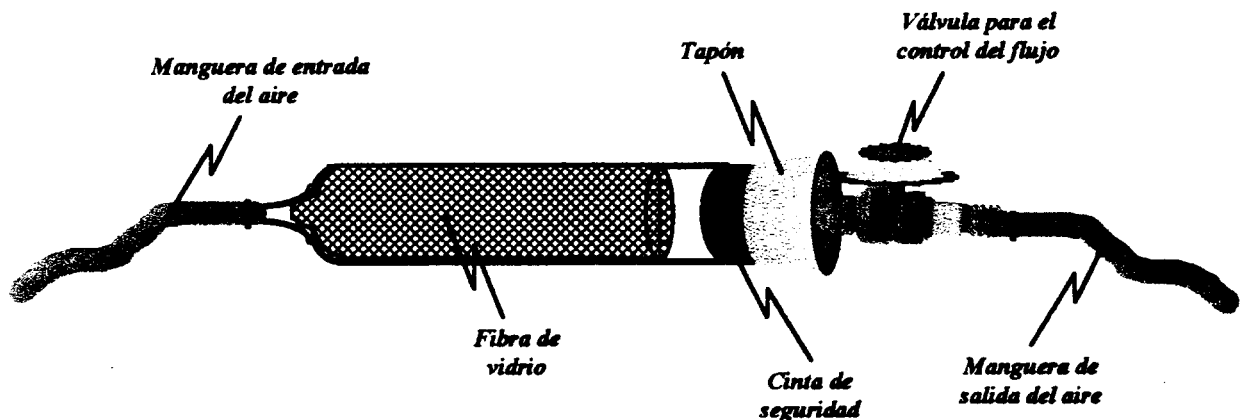
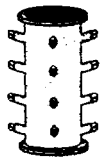


Fig 4.1.6. Filtro de aire empleado durante las fermentaciones



4.2 Producción de fenol-oxidasa

4.2.1 Microorganismo, soporte y medio de cultivo

El microorganismo empleado fue *Streptomyces cyaneus* var. *Viridochromogenes* UAH 15, el cual fue aislado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá de Henares (UAH). La cepa fue mantenida en suspensión de esporas en una solución al 20% v/v de glicerol a -70°C.

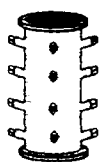
Se empleó como soporte-sustrato, paja de trigo cuyo diámetro de partícula estuvo entre malla 35 y 150 (con un diámetro promedio de 0.15mm). A este se le añadió medio base salino MBS (Crawford, 1978; *Tabla 4.2.1*), complementado con 0.6% de extracto de levadura.

Tabla 4.2.1 Medio Base Salino (MBS)

Compuesto	g/L
KH_2PO_4	1
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	4
$NaCl$	0.2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05
Oligoelementos	0.1% v/v
Oligoelementos	g/100ml
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.64
$FeSO_4 \cdot H_2O$	0.11
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.8
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15

4.2.2 Inóculo, configuraciones y condiciones de la fermentación

Inóculo: A partir de la suspensión de esporas, fueron inoculadas 40 cajas Petri conteniendo medio Bennet, incubadas a 29°C durante 6 días. Pasado este tiempo, las



esporas se recolecta con 50 ml de una solución de Tween 80 al 0.01%. Con la suspensión de esporas obtenidas fue inoculado 1 litro de MBS (distribuido en 5 matraces Erlenmeyer de 500 ml) suplementado con 1% de extracto de levadura incubado a 29°C durante 48 hrs y a 150 rpm.

Configuraciones: Para este experimento fueron probadas tres geometrías. Las tres relaciones Longitud/Diámetro empleadas (L/D) fueron: 0.7, 2.13 y 5.09 (*Fig 4.2.1*). Debido que en los módulos los diámetros están fijos, se estimaron las longitudes del material a fermentar (L_t) dentro de cada reactor para así obtener la relación L/D deseada ($L/D=f(L_t)$).

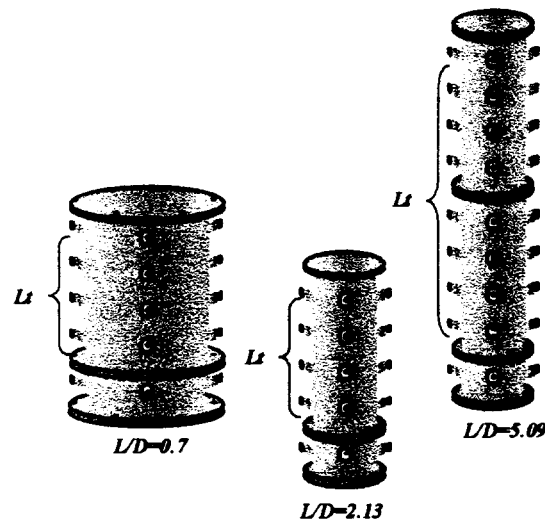
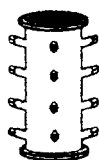


Fig. 4.2.1 Configuraciones probadas en la producción de la Fenol-oxidasa. Relaciones L/D empleadas para este experimento.

Condiciones de la fermentación: Para adicionar la cantidad necesaria de agua y los diferentes componentes de la mezcla del material a fermentar, se hizo un balance de materiales tomando en cuenta: la densidad de empaque (0.5 kg/L), la longitud de empaque (L_t), los sólidos, la humedad de la paja de trigo, y la humedad inicial del material a fermentar. El agua fue distribuida en tres fracciones. La primera fracción se ocupó en el pretratamiento (autoclave a 0.1 atmósferas durante 1 h) y esterilización del sustrato (a 120°C durante 20 min). La segunda fracción fue empleada para la



propagación del inóculo (1L), con la cual la cantidad total de sustrato fue inoculada. La última fracción se ocupó para preparar una solución de MBS, que al ser adicionada permitió alcanzar una humedad del 80%. La mezcla fue homogeneizada, tomándose una muestra inicial, para determinar el pH, el cual fue de 6.6. Cada uno de los reactores fue empacado hasta la altura estimada para alcanzar la relación L/D respectiva. La inoculación, homogeneización y empaque, se llevaron a cabo en condiciones de asepsia en campana de flujo laminar. Los reactores (Fig. 4.2.2), fueron incubados a 29°C durante 3 semanas y sometidos a una aireación de 1VKgM (1 L de aire por Kg de medio húmedo por minuto).

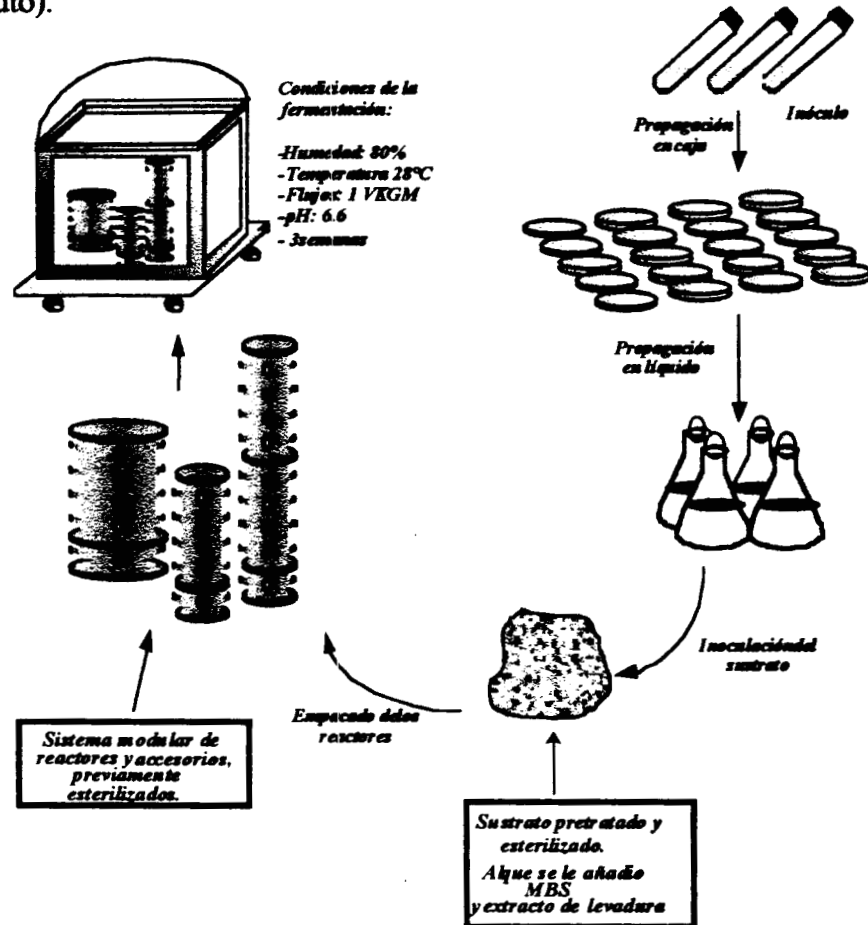
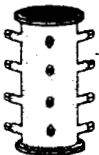


Fig. 4.2.2 Condiciones de la fermentación para la producción de fenol-oxidasa



4.3 Producción de Conidiosporas

4.3.1 Microorganismo, soporte y medio de cultivo

Se utilizó la cepa de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin CDBB H-987 proporcionada por la colección de microorganismos del CINVESTAV (IPN). Este microorganismo fue aislado en una región agrícola de Cuba, a partir de muestras, de insectos infectados colectados en el campo. Para conservar las esporas, se utilizó la técnica de conservación por suspensión de glicerol 10 % y refrigeración a -20 °C.

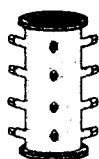
Como soporte se utilizó bagazo de caña proveniente del ingenio “Emiliano Zapata”, Zacatepec, Mor. Para acondicionarlo como soporte fue necesario lavarlo y tamizarlo adecuadamente, para eliminar los contaminantes y homogeneizar el tamaño de las partículas, el cual estuvo entre malla 20 y 30 (con un diámetro promedio de 0.70 mm), con una humedad de 2.43 %. El medio de cultivo empleado, se muestra en la *Tabla 4.3.1*

Tabla 4.3.1 Medio de cultivo empleado para la producción de Conidiosporas

Compuesto	g/L
Glucosa	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.6
KH ₂ PO ₄	0.68
Extracto de Lev	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
Oligoelementos	0.2% v/v

4.3.2 Inóculo, configuraciones y condiciones de la Fermentación

Inóculo: En 5 matraces Erlenmeyer de 1L de capacidad, se adicionaron aproximadamente 200 ml de medio de cultivo para propagación del inóculo. La composición del medio para la propagación del inóculo fue el mismo que se indica en la Tabla 2,



solamente con agar (2g/L). Los matraces fueron preinoculados con 2 ml de suspensión de esporas que contenía 10^7 esporas/ml. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 29°C durante 7 días. La extracción de las esporas se hizo con 25 ml/matraz de una solución de Tween 80 (0.01 %) y agitación mecánica.

Configuraciones: Para este experimento, al igual que el anterior, fueron probadas tres relaciones L/D : 1.2, 2.4 y 4.8. Para obtener las relaciones L/D deseadas, se estimó la longitud del material a fermentar (L_f) dentro de cada reactor (*Fig 4.3.1*).

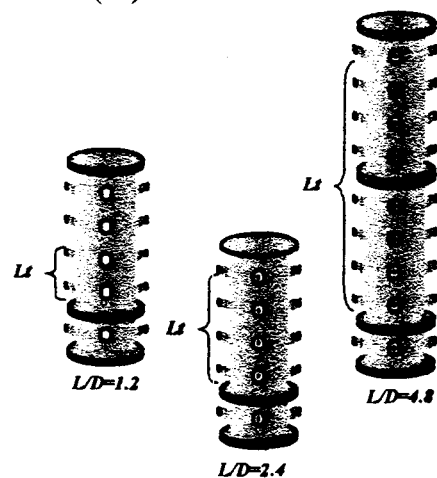
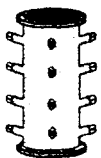


Fig 4.3.1 Configuraciones probadas en la producción de Conidiosporas

Condiciones de la fermentación: Las cantidades de agua y bagazo necesarias se determinaron mediante un balance de materiales, teniendo en cuenta la humedad del bagazo, los contenidos de sólidos, la densidad de empaque (0.25 kg/L), la longitud de empaque (L_f) y la humedad requerida al inicio de las fermentación. La cantidad de agua se dividió en tres fracciones. Primera fracción: El 20 % del total de agua se mezcló con el bagazo para garantizar su esterilización completa; Segunda fracción: Otro 70 % se utilizó para disolver los componentes del medio de cultivo; Tercera fracción: El 10 % restante, se empleó para formar la suspensión de esporas necesaria para el inóculo. La cantidad de bagazo humedecida con la primera fracción de agua y los componentes del medio de cultivo disueltos en la segunda fracción se esterilizaron por separado en



autoclave durante 15 min a 120°C Después de la esterilización, el volumen de suspensión de esporas necesaria para el inóculo se mezcló con la solución de componentes medio de cultivo y la mezcla resultante se adicionó poco a poco al bagazo estéril, agitando continuamente para homogeneizar el medio sólido. Por último se empacaron los reactores de manera tal que la densidad del empaque fuera homogénea en toda la altura del lecho de sólidos. El proceso de inoculación, homogeneización y empaque se llevó a cabo en condiciones de asepsia, en campana de flujo laminar. Las condiciones de cultivo empleadas en el experimento fueron: Inoculo 10^7 esporas/ g de medio sólido húmedo, humedad inicial 75 %, flujo de aire 0.75 vkgm (0.75 L de aire por Kg de medio por min) e incubación en la cámara de calentamiento a 29°C durante 7 días (Fig. 4.3.2).

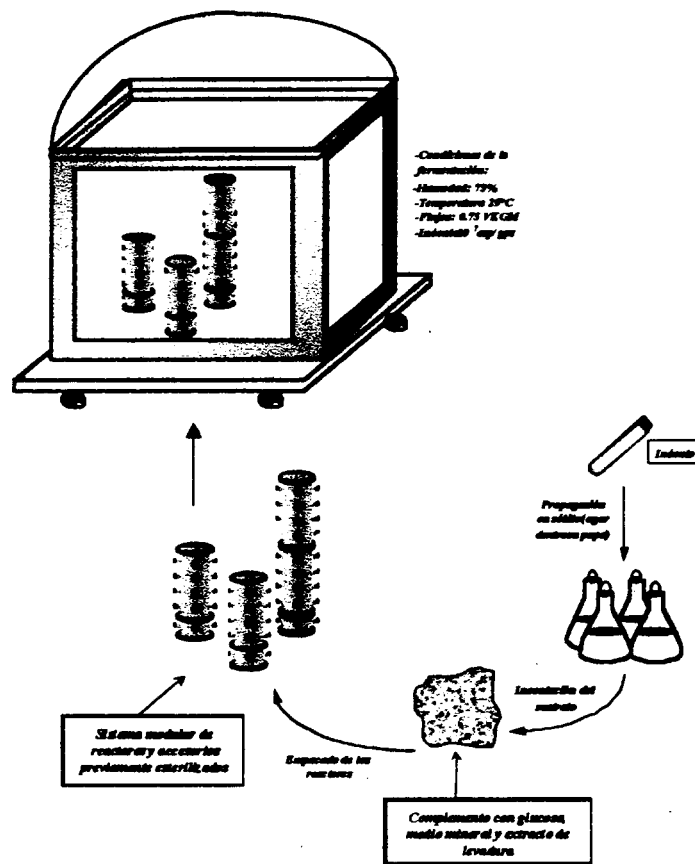
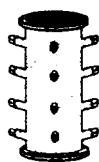


Fig. 4.3.2. Condiciones de la fermentación para la producción de Conidiosporas



4.4 Producción de mananastas

4.4.1 Microorganismo, soporte y medio de cultivo

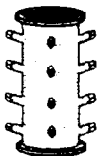
Se utilizó el hongo filamentoso *Aspergillus oryzae* 2094 de la Planta Piloto de Fermentaciones en Estado Sólido de la UAM Iztapalapa. Las esporas se mantuvieron conservadas en agar y refrigeración a -20 °C.

Como soporte-substrato se utilizó pasta de copra, desecho agrícola en la industria manufacturera de los derivados del coco. Para ser empleado como soporte fue necesario tamizarlo para homogeneizar el tamaño de partícula, el cual estuvo entre malla 20 y 35 (con un diámetro promedio de 0.62 mm), con una humedad de 5%. En este caso no se empleó medio mineral, pues se consideró que el substrato contiene los componentes (fuentes de C, N y minerales) necesarios para el crecimiento y la producción de la enzima.

4.4.2 Inóculo, configuraciones y condiciones de la Fermentación

Inóculo: En 6 matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, se adicionaron aproximadamente 100 ml de medio agar dextrosa-papa. Los matraces fueron preinoculados con 2 ml de suspensión de esporas con 2×10^7 esporas/ml. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 31° C durante 5 días. La extracción de las esporas se hizo con 20 ml/matraz de una solución de Tween 80 (0.01%) y agitación mecánica.

Configuraciones: En esta última fermentación, y al igual que en las anteriores fueron probadas 3 relaciones *L/D*: 0.83, 2.13 y 5.09; estimándose la longitud del material



a fermentar (Lt) dentro de cada reactor para obtener las relaciones L/D deseadas (Fig. 4.4.1).

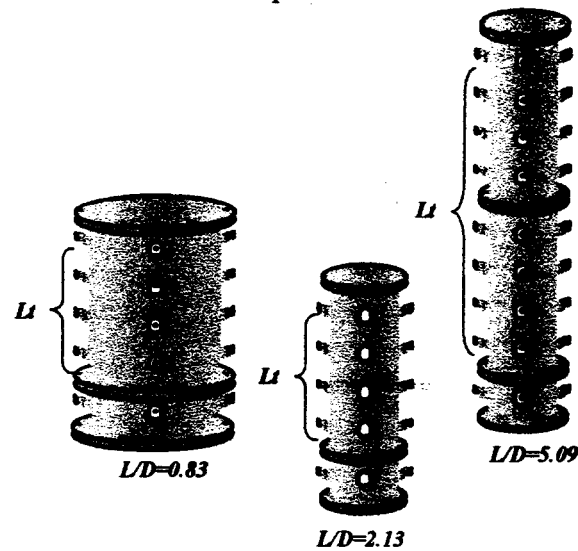
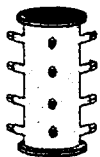


Fig. 4.4.1 Configuraciones probadas en la producción de Mananasas

Condiciones de la fermentación Las cantidad de agua y pasta de copra ocupados para la fermentación, se determinaron mediante un balance de materiales, tomando en cuenta la humedad de la copra, la densidad de empaque (0.45 kg/L), la longitud de empaque (Lt) y la humedad requerida al inicio de las fermentación. La cantidad de agua fue dividida en dos fracciones. Primera fracción: El 40 % del total de agua se mezcló con la copra; Segunda fracción: El restante 60 %, se empleó para formar la suspensión de esporas necesaria para el inóculo y agua estéril extra para alcanzar la humedad inicial (60%). El volumen de suspensión de esporas necesaria para el inóculo, agua estéril y la copra humedecida se mezclaron, agitando continuamente para homogeneizar el cultivo sólido. Por último los reactores fueron empacados de manera tal que la densidad del empaque fuera homogénea en toda la altura del lecho de sólidos. Las condiciones de cultivo empleadas en el experimento fueron: Inoculo 10^7 esporas/g de medio sólido húmedo, humedad inicial 60 %, flujo de aire 3 vkgm (3 L de aire por kg de medio por min) e incubación en la cámara de calentamiento a 31°C durante 4 días (Fig. 4.4.2).:



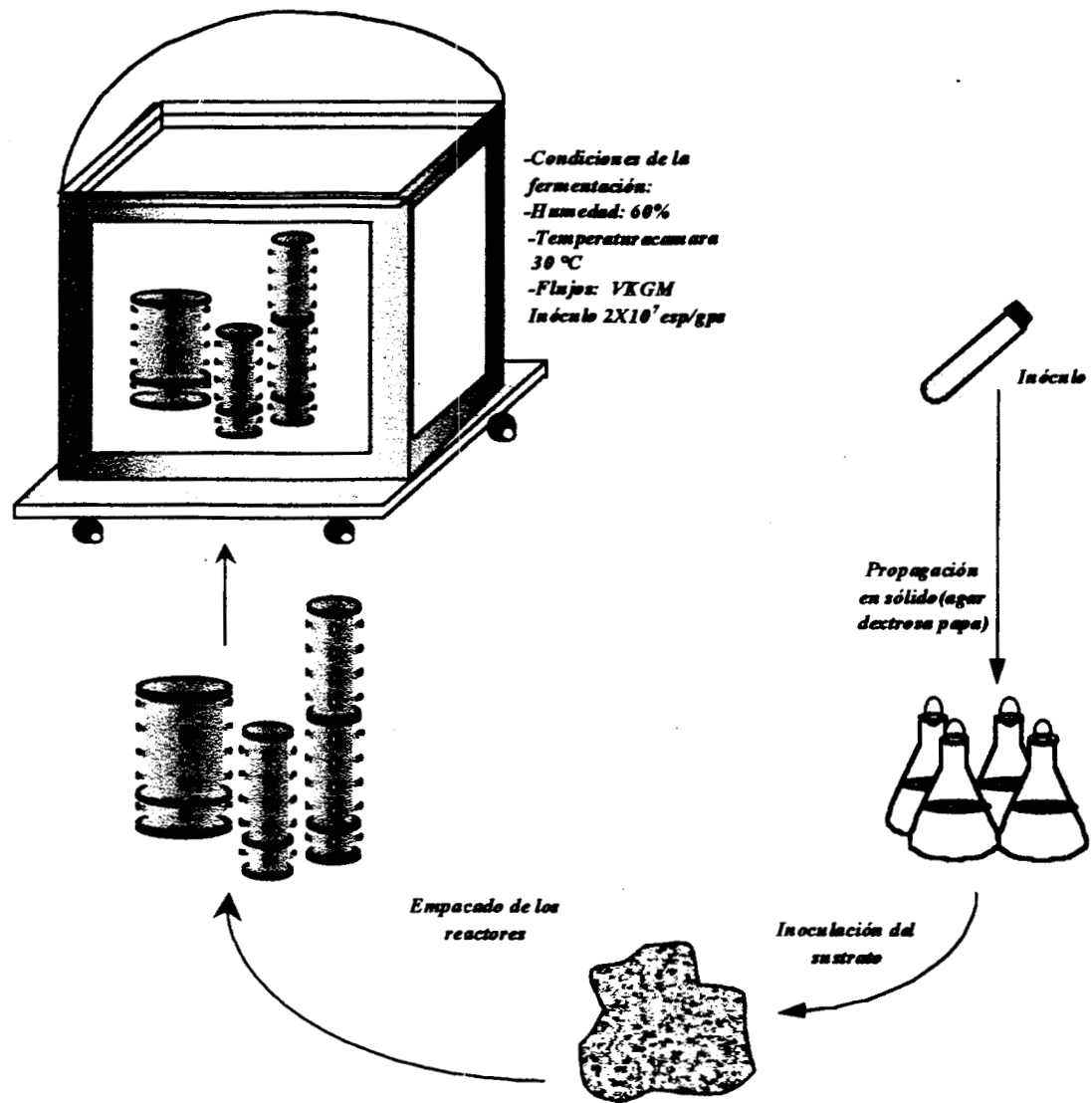
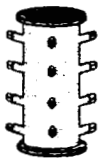


Fig 4.4.2 Condiciones de la fermentación para la producción de Mananasas



4.5 Determinación de las cinéticas de gases y temperatura

4.5.1 Gases

Las cinéticas de gases (CO_2 y O_2) se determinaron a la salida de cada reactor (*Fig 4.5.1*). Para poder llevar a cabo la cuantificación, se utilizó un sistema desarrollado en la UAM- Iztapalapa (Planta Piloto de Fermentaciones) que consta de los siguientes elementos:

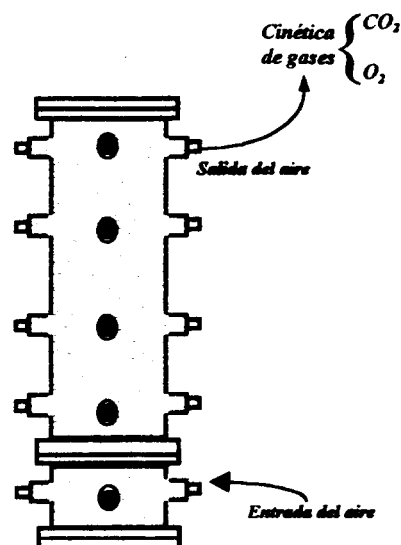
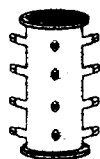


Fig 4.5.1. La cinética de gases determinada a la salida de cada reactor.

Medidor de flujo de la mezcla de gases: Neumotacómetro (Hans Rudolf Inc. 8300A) su principio de funcionamiento se basa en detectar la diferencia de presión que se crea en el flujo de gases al pasar por una malla muy fina, la diferencia de presión se convierte en una señal eléctrica proporcional al flujo de gases.

Detector de CO_2 : Espectrofotómetro de absorción en infrarrojo (Servomex 1505). Su principio de funcionamiento se basa en detectar la diferencia de presión que se produce en un diafragma que separa dos cámaras una de medición y una de referencia, la diferencia de presión se relaciona con la diferencia de concentraciones de CO_2 entre el



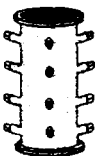
gas de referencia y el gas medido y se convierte en una señal eléctrica proporcional a la concentración de CO₂ en el gas medido.

Detector de O₂: Paramagnético (Servomex 1111/000) Su principio de funcionamiento se basa en que las moléculas de oxígeno se orientan cuando al gas se le aplica un campo magnético, el sensor consta de una varilla con sendas esferas en los extremos suspendida en un campo magnético dentro de una cámara que se sella cuando entra el gas medido de tal forma que la varilla es empujada fuera del campo con una fuerza de torque proporcional a la concentración de O₂ en la muestra, para contrarrestar este torque el sistema genera una corriente de retroalimentación proporcional al torque y se mide por un voltaje de salida proporcional.

Además este sistema posee una computadora provista de un programa, desarrollado también en la UAM- Iztapalapa, que permite realizar la calibración automática de los detectores, la programación de la frecuencia de los análisis, y el almacenamiento de forma continua de los resultados de hasta 11 muestras de flujo de gases; de las cuales únicamente fueron ocupadas 3 por fermentación. La calibración se realizó cada 4 horas mediante el suministro de flujos de N₂ y de una mezcla de concentraciones conocidas de CO₂ y O₂. El programa es capaz de almacenar en forma de tablas los datos resultantes de los análisis de CO₂ y O₂ en forma de por ciento, así como el flujo de gas (en ml/ min) de cada muestra que entro al sistema.

4.5.2 Temperatura

Durante la producción de *fenol-oxidasa* y *conidiosporas*, las cinéticas de temperatura, se realizaron únicamente en el reactor con la mayor relación *L/D*. Estas se



determinaron en 6 diferentes puntos del reactor de acuerdo a las siguientes coordenadas cilíndricas:

Alturas: *hi* altura inferior (3cm), *hm* altura media (27cm) y *hs* altura superior (51cm).

Radios: *rp* radio pared (0 cm) y *ro* radio centro (5.4cm)

De acuerdo a estas coordenadas, los 6 puntos para las cinéticas fueron: *hirp*, *hmrp*, *hsrp*, *hiro*, *hmro* y *hsro*. También se determinaron las temperaturas del flujo de entrada (*EA*) y salida (*SA*) en el fermentador, así como la temperatura alrededor de este (*TA*=Temp cámara de calentamiento) (Fig. 4.5.2).

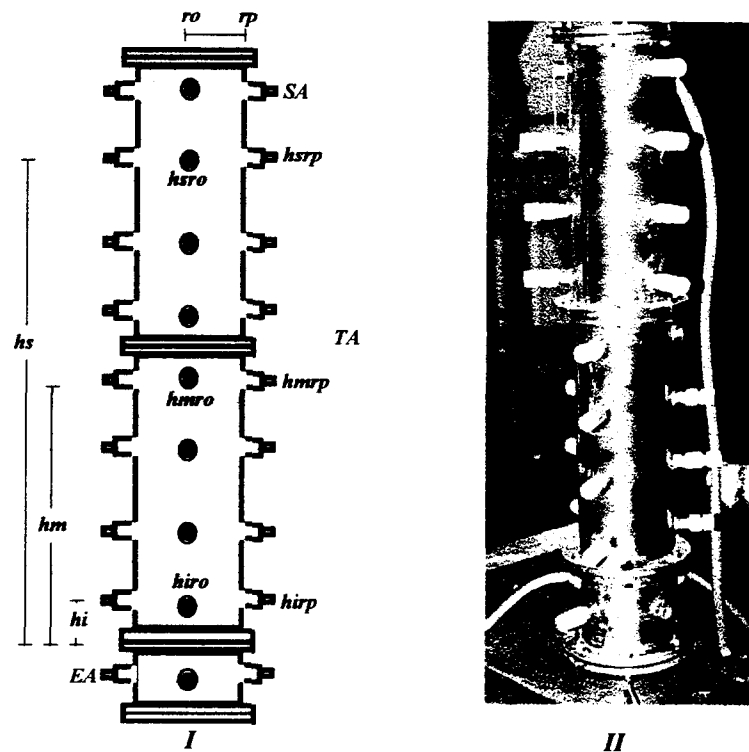
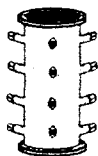


Fig 4.5.2. Configuración del reactor. I. Puntos en los que se determinaron las cinéticas de temperatura en la producción de fenol-oxidasa y conidiosporas. II. Vista del reactor con mayor relación *L/D*.



Para la producción de *mananasas*, las cinéticas de temperatura, se realizaron en las tres relaciones L/D probadas. En este experimento, la cinética de temperatura fue determinada únicamente en dos puntos para cada reactor *hmro* (altura media radio centro) y *hmrp* (altura media radio pared). También se determinaron las temperaturas del flujo de entrada (*EA*) y salida (*SA*) en cada fermentador, así como la temperatura alrededor (*TA*) de estos (*Fig 4.5.3*).

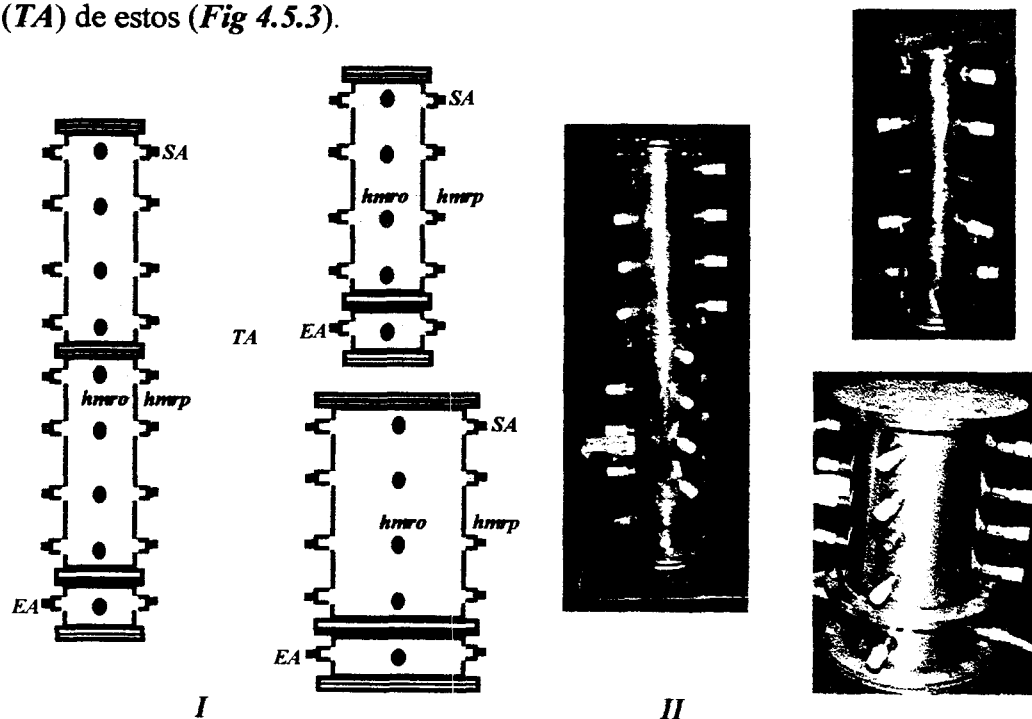
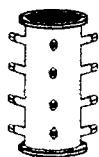


Fig 4.5.3. I. Puntos en los que se determinaron las cinéticas de temperatura, para las tres configuraciones probadas en la producción de mananasas. *II.* Vista general de los reactores.

Para el seguimiento de la temperatura en todos los experimentos, se utilizó un sistema de sensores de temperatura (de 6" de longitud por 1/4" de diámetro), pertenecientes a la familia AD590 (material sensor semiconductor de Analog Device). Junto con los sensores se dispuso de una tarjeta compatible para PC, que permitió convertir las señales analógicas tomadas por los sensores, en señales digitales, y así



permitir la captura de datos. También se contó con un programa que llevaba a cabo la autocalibración de los sensores, así como el almacenamiento de los datos en forma tabular. En la *Fig. 4.5.4*, se muestra una vista global del proceso de fermentación, con los sistemas para la medición de gases y temperatura

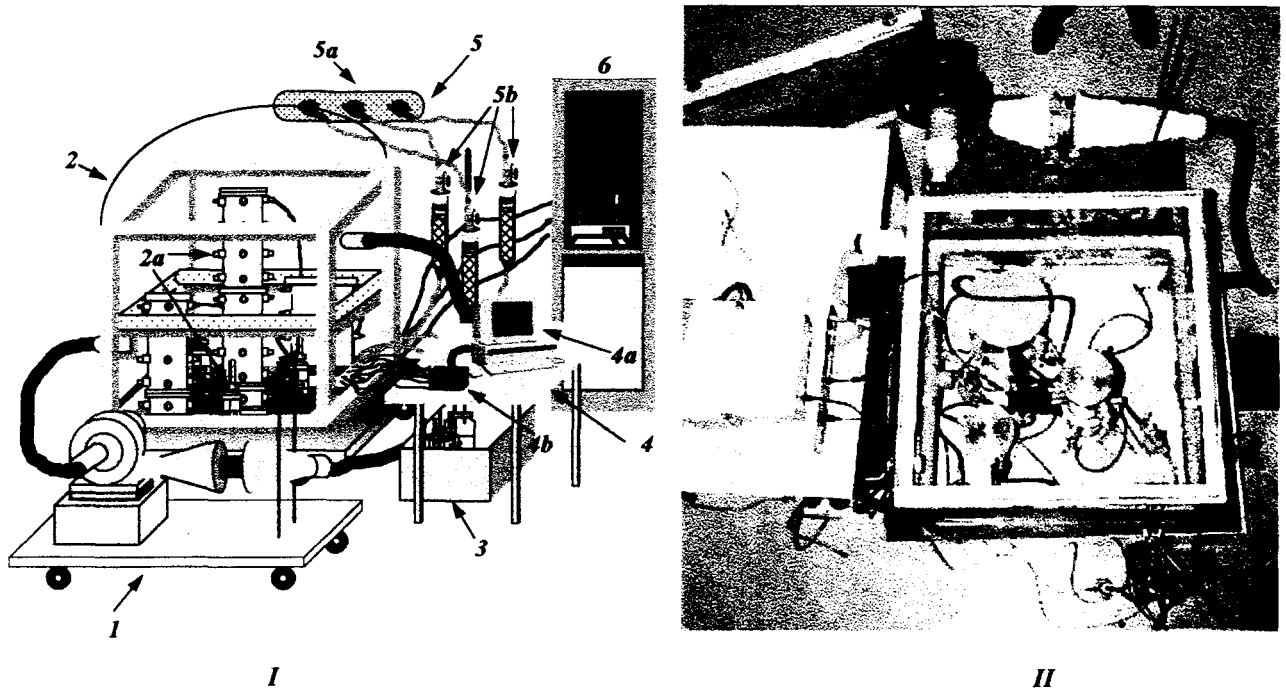
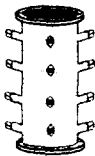


Fig 4.5.4 Esquematación global del proceso de Fermentación. *I.* Componentes 1) Sistema de calentamiento de la cámara; 2) Cámara de calentamiento, 2a) Reactores modulares y humidificadores internos; 3) Baño de temperatura y humidificadores externos; 4) Sistema para la medición de temperatura, 4a) PC con el programa para la captura y calibración de datos, 4b) Tarjeta o interfase del sistema de medición de temperatura; 5) Sistema de alimentación de aire, 5a) Distribuidor, 5b) filtros; 6) Sistema para la medición de gases. *II.* Vista superior del proceso.

4.6 Muestreo del material fermentado y técnicas analíticas

En esta sección, se describen los procedimientos utilizados para la toma de muestras del material fermentado, así como las técnicas empleadas para el análisis de las mismas. Además, se describe de que manera fue determinado el volumen de inóculo, así



como el Re (número de Reynolds), los cuales son dos parámetros de suma importancia para este tipo de procesos.

4.6.1 Muestreo

En la *Figura 4.6.1a*, se muestra de que manera se tomaron las muestras del material fermentado. De acuerdo a la Lt (longitud de empaque), el material fermentado obtenido en cada configuración fue dividido en 3 secciones iguales (hi , hm y hs), de tal manera que cada sección fuera $1/3$ de la longitud total ($h = 1/3 Lt$).

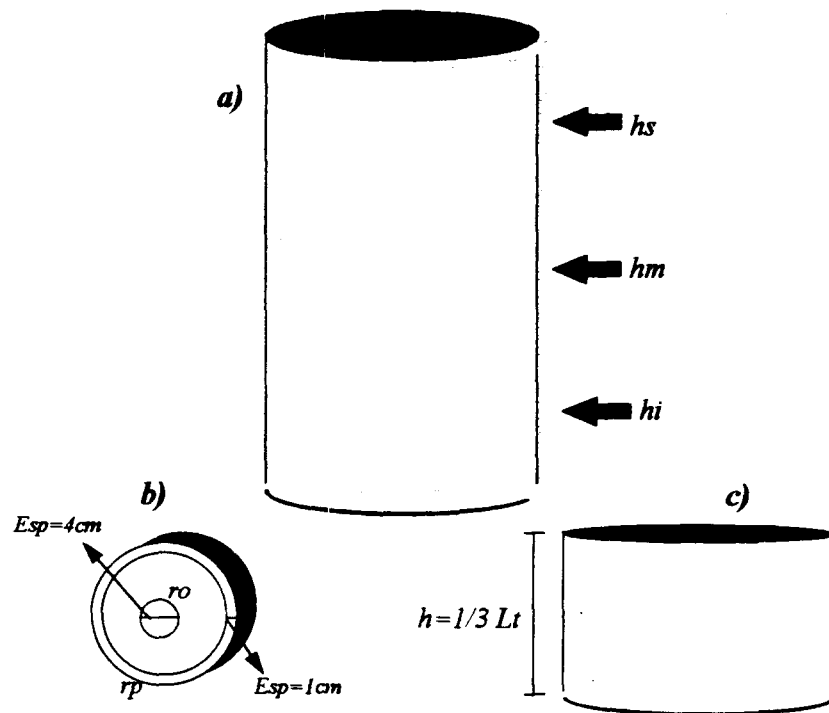
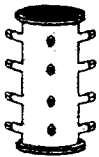


Figura 4.6.1 Representación esquemática de las posiciones y la forma de las tomas de muestras en el material fermentado provenientes de los reactores. a) posiciones para la toma de muestras en el lecho de sólidos; b) corte transversal del lecho mostrando el espesor de la muestra tomada en el centro y la periferia c) corte longitudinal de la cama de sólidos mostrando la altura (h) de los cortes para las muestras tomadas.



Posteriormente de cada sección, fueron tomadas muestras de ≈ 12 g tanto de la periferia (*rp*, con un espesor de 1cm), como del centro (*ro*, con un diámetro de 4cm). Por cada configuración probada, se obtuvieron 6 muestras: *hiro*, *hirp*, *hmro*, *hmrp*, *hsro*, *hsrp*. A cada una de las muestras, se les realizaron diferentes pruebas analíticas, para obtener perfiles axiales (*Fig 4.6.2a*) de los principales parámetros (pH, %Hum, aw, actividad enz, etc).

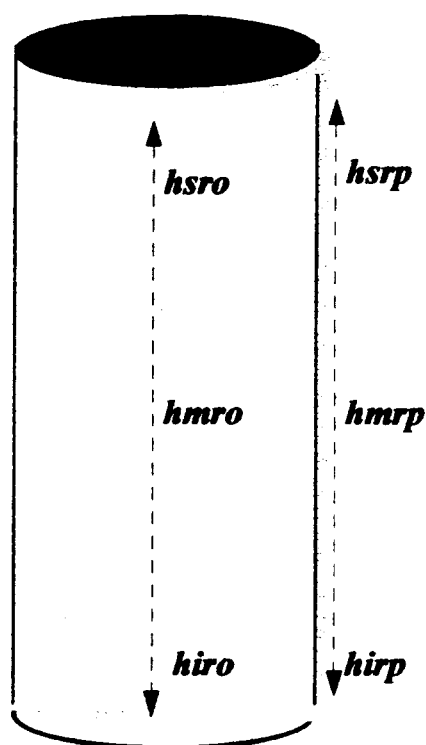
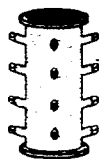


Fig 4.6.2a. Determinación de perfiles axiales de pH, %Humedad, aw, actividad enzimática etc. en el material fermentado

En la *Fig. 4.6.2b*, se muestran diferentes imágenes en el muestreo del material fermentado.



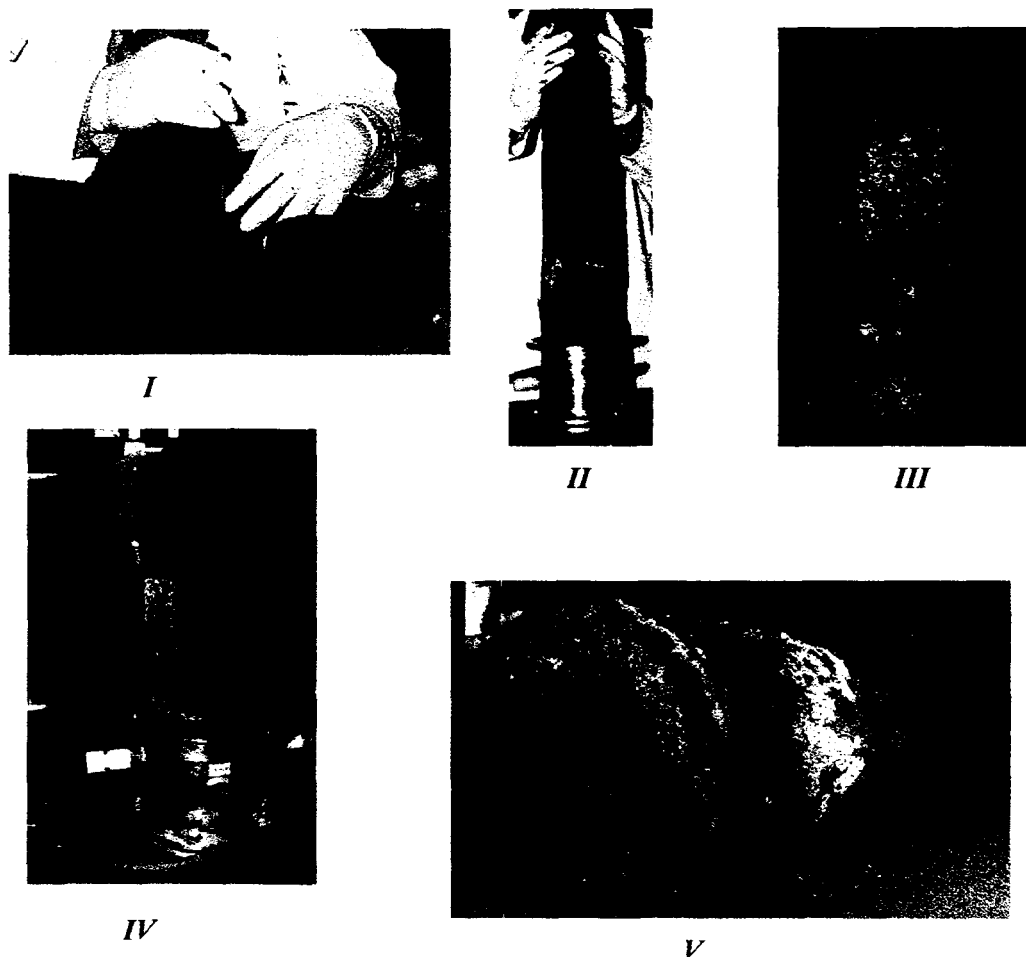


Fig. 4.6.2b. Muestreo del material fermentado. *I.* Seccionamiento del material. *II.* Desempaque del material correspondiente al reactor de mayor longitud. *III, IV y V.* Diferentes vistas de los materiales fermentados en los diferentes reactores.

4.6.2 pH

A 1g del material húmedo de cada muestra, se le adicionaron 10 ml de agua destilada. La suspensión formada, fue sometida a agitación constante con mosca magnética durante 5 min. Al cabo de este tiempo y manteniendo la agitación, se midió el pH mediante potenciómetro digital (Conductronic pH 20) provisto de un electrodo combinado, tal como se ve en la **Fig. 4.6.3**. El potenciómetro se calibró previamente con soluciones amortiguadoras (Sigma de México S. A. de C. V.) de pH 4.0 y 7.0.

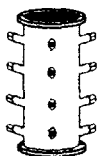




Fig. 4.6.3. Potenciometro Conductronicc pH 20 empleado para la determinación del pH

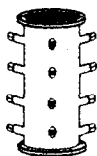
4.6.3 Porcentaje de Humedad

Esta se determinó por diferencia de peso entre el material húmedo y el material seco. Así a 5 g del material húmedo de cada muestra, se puso a secar en estufa durante 24 hr a 60°C. De esta forma el % de humedad se determinó por (Ec. 4.6.1):

$$\%Humedad = \left\{ 1 - \left(\frac{W_{sopHum} - W_{sopsec}}{W_{sopHum}} \right) \right\} 100 \text{ ----- 4.6.1}$$

donde:

- W_{sopHum} : Peso del material húmedo
- W_{sopsec} : Peso del soporte seco a 60°C, 24hrs



4.6.4 Actividad de agua (A_w)

Este parámetro fue determinado por medio de un equipo CX-2 (DECAGON, *Fig. 4.6.4*), el cual consta de un pequeño ventilador en su interior que permite la recirculación del aire sobre la superficie de la muestra introducida ($\approx 0.5g$), acelerando el equilibrio a la presión de vapor del agua. Un sensor infrarrojo mide la temperatura de la superficie de la muestra y un espejo interno enfría hasta llegar a la condensación del vapor de agua a la temperatura de rocío. Mediante las temperaturas de superficie y el punto de rocío, un sistema de computo interno calcula la actividad de agua. La técnica consiste en colocar la muestra en una pequeña celda de plástico e introducirla al equipo, para que al cabo de unos minutos muestre el valor de la a_w .

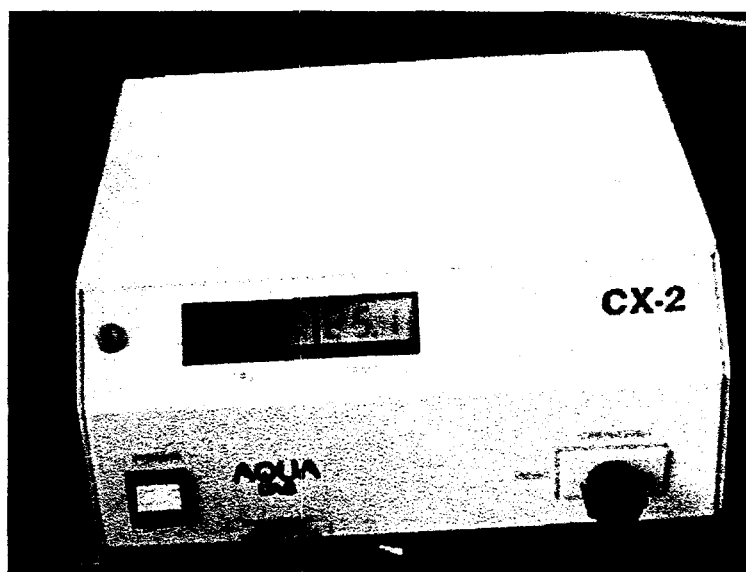
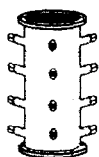


Fig. 4.6.4 Equipo Decagon CX-2, empleado para la determinación de la actividad de agua.



4.6.5 Inóculo y cuantificación de esporas

Para la producción de *conidiosporas* y *mananastas*, el número de esporas/ml (N) de la suspensión recolectada (con una solución de Tween 80 al 0.1%) en la propagación del inóculo, se determinó por (Ec. 4.6.2):

$$N = P * F * D \text{ ----- } 4.6.2$$

donde:

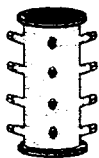
- N : Número de esporas /ml
- P : Promedio del número de esporas contadas en la cámara de Neubauer
- F : Factor de la cámara empleada (1×10^4)
- D : Dilución empleada para el conteo de esporas

El volumen de la solución anterior (V_{inoc}), necesario para la inoculación del soporte-substrato, estuvo dado por (Ec. 4.6.3):

$$V_{inoc} = \frac{W_{sim} * \Omega}{N} \text{ ----- } 4.6.3$$

donde:

- V_{inoc} : Volumen de inóculo (ml)
- W_{sim} : Peso seco inicial del soporte-substrato (g)
- N : Número de esporas/ml de la solución recolectada con Tween 80
- Ω : Número de esporas por gramo de peso seco de soporte-substrato (esp/gps)

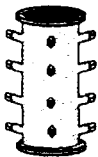


En la producción de conidiosporas, éstas fueron cuantificadas como número de esporas por unidad en peso seco de soporte-substrato (Φ). Para esto 5 g de cada muestra, se mezclaron con una solución de Tween 80 (0.01%) en proporción 1:1, manteniéndose en agitación con barra magnética durante 20 min, esto con la finalidad de extraer las esporas. La suspensión resultante se filtró por lana de vidrio para eliminar los restos de micelio que dificultaban la determinación del número de esporas. A la suspensión filtrada se le realizó el conteo de esporas mediante cámara de Neubauer. De esta forma el número de esporas por unidad en peso seco de soporte-substrato, vino dado por (Ec. 4.6.4):

$$\phi = \left(\frac{P * F * De}{W_{muest}} \right) V_{sol} \text{ ----- } 4.6.4$$

donde:

- Φ : Número de esporas por unidad en peso seco de substrato (esp/gps).
- P : Promedio del número de esporas contadas en la cámara de Neubauer.
- F : Factor de la cámara empleada (1×10^4).
- De : Dilución empleada para el conteo de esporas.
- V_{sol} : Volumen de la solución de Tween 80 empleada para la extracción.
- W_{muest} : Peso seco de la muestra empleada en la extracción.



4.6.6 Actividades enzimáticas y proteína

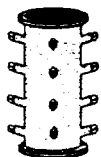
Extracto enzimático: A 5g de cada muestra se les adicionaron 10ml de agua destilada. La torta formada fue prensada a 2000 psi (140.74 kg/cm²). El extracto obtenido fue centrifugado a 5,000 rpm durante 10 min, determinándose proteína soluble y actividad enzimática en el sobrenadante.

Proteína soluble: Esta se determinó espectrofotométricamente, mediante un microensayo de Bradford. Del sobrenadante de cada extracto enzimático, fueron tomados 80µl que se diluyeron con 720µl de agua destilada (diluciones 1:10). A cada dilución le fueron adicionados 200µl del reactivo de Bradford, siendo posteriormente homogeneizadas y leídas a 595 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. Basándose en la curva estándar (en la que se utilizó albúmina como estándar), la concentración de proteína soluble está dada por la Ec. 4.6.5. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

$$\rho = \frac{D(Abs - b)}{m} \text{ ----- 4.6.5}$$

donde:

- ρ : Microgramos de proteína soluble por ml extracto ($\mu\text{gP/ml}$).
- D : Factor de dilución empleado (10).
- Abs : Absorbancia leída a 595 nm
- b : Ordenada de la recta de la curva de calibración (0.0076)
- m : Pendiente de la recta de la curva de calibración (0.0326 ml/ μg)



La cantidad de proteína soluble por unidad en peso seco del soporte-substrato ($\mu\text{gP/gps}$) está dada por (Ec.4.6.6):

$$\rho_s = \rho \left(\frac{V_{ext}}{W_{muest}} \right) \text{-----} 4.6.6$$

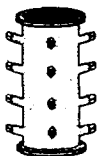
donde:

- ρ_s : Microgramos de proteína soluble por gramo seco de soporte-substrato ($\mu\text{gP/gps}$)
- V_{ext} : Volumen de agua destilada empleado en la extracción (10 ml)
- W_{muest} : Peso seco de la muestra empleada en la extracción (gps).

Actividad de fenol-oxidasa (ξ): Esta se determinó espectrofotométricamente por el método de Werner (1970), el cual esta basado en la reacción colorimétrica entre la fenol-oxidasa y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzadialina)-6-sulfónico (SIGMA, con siglas ABTS y PM=548.7 g/mol).

Del sobrenadante del extracto enzimático de cada muestra, fueron tomados 400 μl , a los cuales les fue adicionado 400 μl de una solución 0.010 M de ABTS a pH= 4.8. Cada solución resultante fue homogeneizada y mantenida a 60°C durante 5 minutos, siendo posteriormente leídas sus absorbancias inicial (A_i , $t= 0$) y final (A_f , $t= 3\text{min}$) en intervalos de 3 minutos y a 436nm, empleándose un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. De esta forma la actividad enzimática de Fenol-oxidasa está dada por la Ec. 4.6.7. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

$$\xi = 1 \times 10^3 \frac{(A_f - A_i)}{V_s * n * \epsilon} \text{-----} 4.6.7$$



donde:

- ξ : Actividad enzimática de Fenol-oxidasa en mU/ml, donde mU es la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 mmol de sustrato por minuto.
- A_i, A_f : Son las absorbancias inicial y final leídas a 436nm
- V_s : Volumen del sobrenadante del extracto enzimático (400 μ l ó 0.4 ml)
- n : Intervalo de tiempo en minutos, en que transcurrió la reacción enzimática.
- ϵ : Actividad molar, número de milimoles de sustrato transformado por milimol de enzima por minuto, cuyo valor para el ABTS-Fenol-oxidasa es de 29,300.

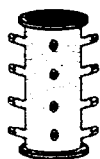
También se estimaron la actividad específica Ec. 4.6.8 (mU/mgP) y la actividad por gramo seco de soporte-sustrato Ec. 4.6.9 (mU/gps):

$$\xi_p = 1000 \frac{\xi}{\rho} \text{ ----- } 4.6.8$$

$$\xi_s = \xi \left(\frac{V_{ext}}{W_{muest.}} \right) \text{ ----- } 4.6.9$$

Actividad de mananasa (ω): Esta se determinó espectrofotométricamente, y se basó en la reacción de hidrólisis entre la enzima y los mananos (sustrato) presentes en la goma de algarrobo (SIGMA). Esta fue cuantificada como μ g manosa/L min. Para poder medir la manosa liberada, se empleó una técnica diseñada en la Universidad de Alcalá de Henares, en la cual la manosa forma un complejo colorimétrico con el ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'biquinolina (SIGMA).

Del sobrenadante de cada muestra, fueron tomados 25 μ l del extracto enzimático, a los cuales les fueron adicionados 25 μ l de una solución al 0.5% de goma de algarrobo (el



substrato fue suspendido por homogeneización y calentamiento a 80°C en una solución tampón de acetato de sodio 0.05M y pH=5.3). Cada una de las suspensiones resultantes (enzima-substrato), fueron incubadas a 37°C durante 15 min. Pasado este tiempo a cada una se les agregó 1ml del reactivo del microensayo (el cual fue preparado con anterioridad y estuvo formado por la mezcla de dos soluciones *A* y *B* en relación 23:1, **Tabla 4.6.1**), poniéndose a 80°C durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo fueron leídas las absorbancias a 562 nm, empleando para ello un espectrofotómetro Shimadzu UV 160-A. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Tabla 4.6.1 Composición de las soluciones del reactivo, para la determinación de la actividad mananasa

Reactivo A	
4,4'-Dicarboxi-2,2'-biquinolina.....	0.60g
Carbonato de sodio anhidro.....	0.36g
Agua destilada.....	500ml

Reactivo B	
<i>Solución 1:</i>	
Ácido aspártico.....	3.7g
Carbonato de sodio anhidro.....	5g
Agua destilada.....	100ml
<i>Solución 2:</i>	
Sulfato cúprico.....	1g
Agua destilada.....	40ml
La solución 1 y 2 se mezclan y se llevan a un volumen final de 150ml	

Para la determinación de la actividad, se consideró un blanco de corrección, consistente en 25µl del extracto enzimático y 25µl de solución amortiguadora (de acetatos, pH=5.3); ésto se hizo con la finalidad de cuantificar la manosa presente en el extracto, y evitar así su interferencia en la determinación de la actividad (**Fig. 4.6.5**).

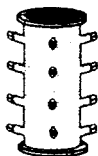




Fig. 4.6.5. Blancos considerados para la determinación de la actividad mananasa.

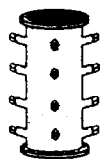
De esta forma la actividad enzimática Mananasa vino dada por (Ec 4.6.10):

$$\omega = 60,000 \left[\frac{Abs_{Muestra} - (Abs_{Correc} + b)}{m \cdot \theta} \right] \text{-----} 4.6.10$$

- ω : Actividad mananasa ($\mu\text{g manosa/L h}$)
- $Abs_{Muestra}$: Absorbancia leída de la muestra a 562 nm
- Abs_{Correc} : Absorbancia leída del blanco de corrección a 562 nm
- θ : Tiempo de incubación enzima-sustrato (15 min)
- b : Ordenada de la recta de la curva de calibración (0.1452)
- m : Pendiente de la recta de la curva de calibración (0.1379 L/mg manosa)

También se estimó la actividad por gramo seco de soporte-sustrato Ec. 4.6.11 ($\mu\text{g Manosa/gps h}$):

$$\omega_s = \frac{\omega}{1000} \left(\frac{V_{ext}}{W_{muest}} \right) \text{-----} 4.6.11$$



4.6.7 Determinación del número de Reynolds (Re)

En la determinación del número de Reynolds en lechos empacados (que es el caso presentado en los procesos de fermentación sólida), se emplea la expresión mostrada en la Ec. 4.6.13 (Levenspiel, 1993):

$$Re = \frac{D_p \cdot V_o \cdot \delta}{\epsilon \mu} \text{-----} 4.6.12$$

donde:

- D_p : Tamaño de partícula (m)
- ϵ : Fracción de espacios vacíos en el lecho (adimensional)
- δ : Densidad del fluido (kg/m^3)
- μ : Viscosidad del fluido (kg/cm seg)
- V_o : Velocidad lineal del fluido (m/s)

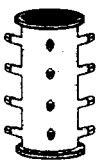
A continuación se describe como fueron determinados cada uno de estos parámetros.

* D_p : El tamaño de partícula, se determinó basándose en la ecuación (Levenspiel, 1993):

$$D_p = \phi \cdot d_{tam} \text{-----} 4.6.13$$

donde:

- ϕ : Esfericidad (adimensional)
- d_{tam} : Diámetro de tamiz (m)



Para cada fermentación en que se ocupó un soporte diferente, se realizó un estudio con microscopio de las partículas del mismo, con la finalidad de poder determinar la esfericidad basándose en la **Tabla 4.6.2**.

Tabla 4.6.2 Esfericidad de partículas (Levenspiel, 1993)

Forma de la partícula	Esfericidad ϕ
Esfera	1.00
Cubo	0.81
Cilindros	
h=d	0.87
h=5d	0.70
h=10d	0.58
Discos	
h=d/3	0.76
h=d/6	0.60
h=d/10	0.47
Arena de playa	0.86
Arena de río	0.53
Sólidos triturados	0.5-0.7
Partículas granulares	0.7-0.8
Trigo	0.85
Anillos Rasching	0.26-0.53
Sillas Berl	0.30-0.37
Sillas níquel	0.14

También, para cada caso fue realizado un análisis por tamizado para determinar d_{tam} , basándose en la Ec.4.6.15 y la **Tabla 4.6.3** (Levenspiel, 1993)

$$d_{tam} = \frac{(Am_{sup} + Am_{inf})}{2} \quad \text{-----} \quad 4.6.14$$

donde:

- Am_{sup} : Apertura de la malla del tamiz superior (m)
- Am_{inf} : Apertura de la malla del tamiz inferior (m)

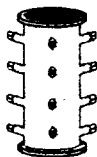


Tabla 4.6.3 Tamaños de tamices estándar (Levenspiel, 1993)

Número de malla (número de alambres/pulg ²)	Apertura de malla (μm)	Número de malla (número de alambres/pulg ²)	Apertura de malla (μm)
3	6680	35	417
4	4699	48	295
6	3327	65	208
8	2362	100	147
10	1651	150	104
14	1168	200	74
20	833	325	53
28	589	400	38

* ϵ : La fracción de huecos, se estimó basándose en la esfericidad de las partículas de los soportes empleados, y la gráfica de la Fig. 4.6.6. Se consideró relleno normal para los procesos de fenol-oxidasa y mananasa ($\rho_{emp} \approx 500 \text{ kg/m}^3$), mientras que en la producción de conidiosporas, se consideró relleno suelto ($\rho_{emp} \approx 250 \text{ kg/m}^3$).

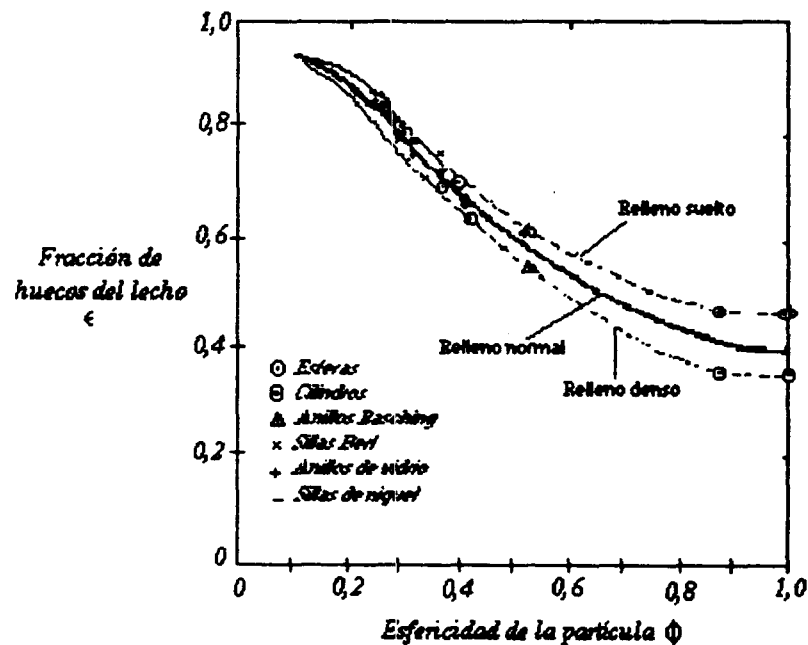
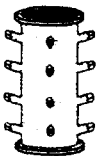


Fig. 4.6.6. Gráfica de fracción de huecos del lecho (ϵ) contra esfericidad de la partícula (ϕ) (Levenspiel, 1993).



* μ y δ : La viscosidad (μ) para el aire de 28 a 30°C (que fue el rango de temperatura del aire a la entrada de los fermentadores en todos los experimentos), viene reportada en 1.8×10^{-5} kg/ms (Perry, 1984).

Para calcular la densidad del aire, este se consideró un gas ideal y se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{M_{aire} P}{RT} \text{-----} 4.6.15$$

donde:

- M_{aire} : Peso molecular del aire. Valor ponderado, calculado a la vez mediante la formula:

$$M_{aire} = M_{N_2} \left(\frac{\%N_{2,aire}}{100} \right) + M_{O_2} \left(\frac{\%O_{2,aire}}{100} \right) \text{-----} 4.6.16$$

- P : Presión atmosférica (de 592 mm Hg ó 0.74 atm a la altura de la ciudad de México)

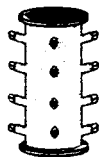
- R : Constante de los gases ideales, 0.082 atm-L/mol °K

- T : Temperatura absoluta (°K) del aire a la entrada de los fermentadores

V_o : La velocidad superficial del aire (*Fig 4.6.7*), es la velocidad que tendría el fluido si el reactor tubular no contuviera sólidos (Levenspiel, 1993).

Esta se relaciona con el flujo y el área transversal a este, mediante la ecuación:

$$V_o = \frac{Q}{A} \text{-----} 4.6.17$$



donde:

- Q : Flujo (m^3/min)
- A : Área transversal al flujo (m^2)

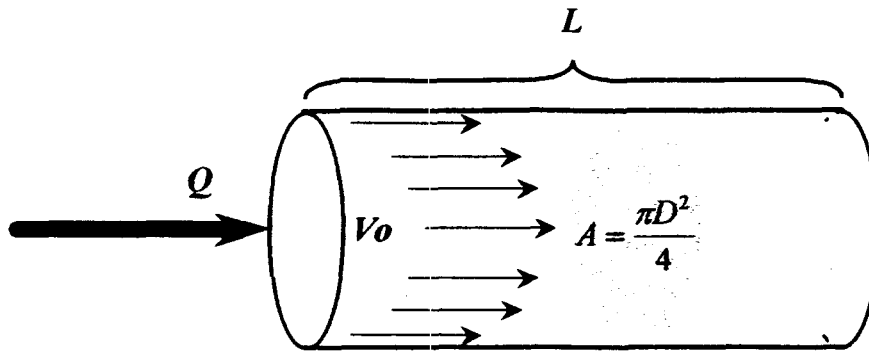


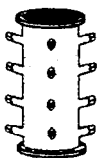
Fig 4.6.7 Relación de la velocidad superficial, con el flujo (Q) y el área transversal al flujo (A).

Debemos observar que el flujo a su vez depende de la tasa específica de aireación ($VKGM$), así como de los kilogramos de soporte húmedo. Estos se relacionan mediante la expresión:

$$Q = \frac{VKGM \cdot W_{sop}}{1000} \text{-----} 4.6.18$$

donde:

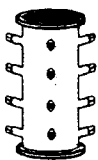
- $VKGM$: Tasa específica de aireación. Litros de aire por kilogramo de soporte húmedo por minuto ($L_{aire}/Kgsop \text{ min}$). Esta expresión se divide entre 1000, para convertir L a m^3 .
- W_{sop} : Kilogramos de soporte húmedo ($Kgsop$)



Substituyendo la *Ec. 4.6.18* en la *Ec. 4.6.17* y tomando en cuenta que el área transversal al flujo viene dada por $A = \pi D^2/4$ (todos los fermentadores son cilíndricos, donde D es el diámetro de la base en metros), la velocidad superficial se determina mediante:

$$V_o = \frac{4 \cdot VKGM \cdot W_{sop}}{1000 \cdot \pi D^2} \text{-----} 4.6.19$$

Así para la determinación del número de Reynolds (Re) en cada una de las fermentaciones realizadas, los parámetros D_p , μ , ϵ y δ se supusieron constantes para todas las configuraciones empleadas. De esta forma V_o es el único parámetro función de dos variables: 1) El flujo con que se alimenta al reactor y 2) El diámetro del reactor ($V_o = f(Q, D)$). Debe resaltarse que estas dos variables son totalmente controladas durante los experimentos.



RESULTADOS Y DISCUSION

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

En este capítulo, se presentan los resultados y análisis referentes a la producción de los metabolitos: fenol-oxidasa, conidiosporas y mananasas en el sistema modular de reactores. Se comienza con las cinéticas de temperatura y gases (CO_2 y O_2). Posteriormente, se continúa con los perfiles axiales (de variables como: humedad, a_w , pH, etc), finalizando con el efecto de la geometría y aireación en la producción de los diferentes metabolitos.

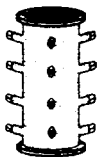
5.1 Cinéticas

5.1.1 Cinéticas de temperatura

Enseguida, se presentan las cinéticas de temperatura obtenidas en cada una de las fermentaciones.

I. Cinéticas de temperatura en la producción de fenol-oxidasa

En la *Figura 5.1.1* se muestran las gráficas correspondientes a las cinéticas de temperatura durante la producción de la fenol-oxidasa. Las cinéticas se tomaron en seis diferentes puntos del reactor con la mayor relación longitud-diámetro ($L/D=5.09$). En las gráficas (a), (b) y (c), se comparan axialmente y en el centro (*ro*) las cinéticas a tres diferentes alturas (altura inferior *hi*, altura centro *hm* y altura superior *hs*), junto con la temperatura de la cámara de calentamiento (*Temp cam*). Aunque en ningún punto se presenta un máximo o mínimo definido, puede observarse que los puntos más calientes durante la fermentación fueron a la altura media y superior (*hmro* y *hsro*), cuyas temperaturas promedios fueron 29.4 ± 1.07 y $29.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ respectivamente; mientras que el punto menos caliente se encontró a la altura inferior cuya temperatura promedio fue



28.1±1.01°C. Los gradientes axiales promedio de temperatura fueron: 0.008°C/cm (*hsro-hmro*) y 0.054°C/cm (*hmro-hiro*).

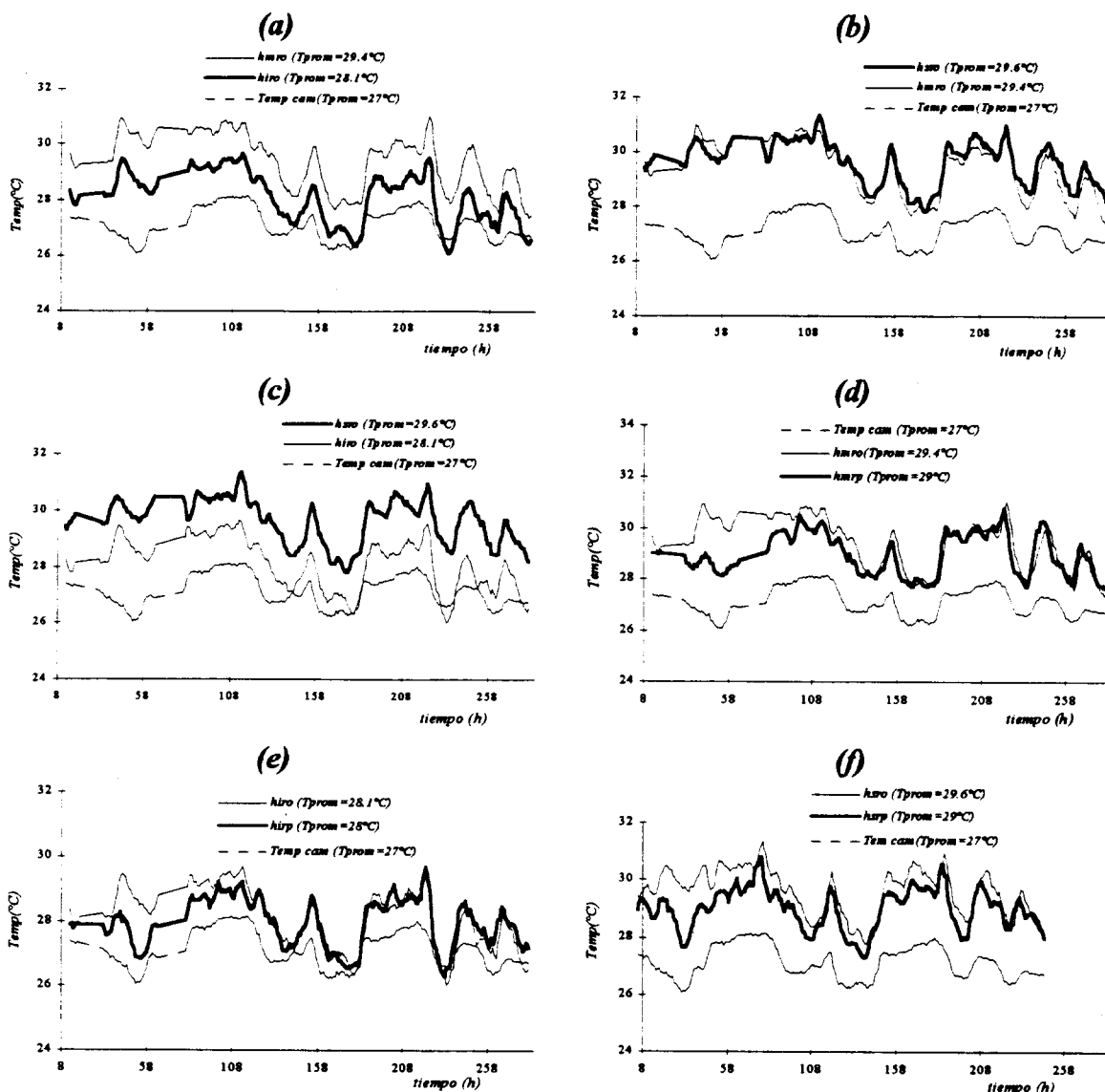
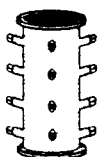


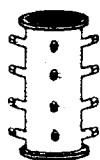
Fig 5.1.1 Cinéticas de Temperatura en la producción de fenol-oxidasa, correspondientes al reactor con $L/D=5.09$. (a) altura inferior radio centro (*hiro*) vs altura media radio centro (*hmro*), (b) altura superior radio centro (*hsro*) vs altura media radio centro (*hmro*), (c) altura inferior radio centro (*hiro*) vs altura superior radio centro (*hsro*), (d) altura media radio centro (*hmro*) vs altura media radio pared (*hmrp*), (e) altura inferior radio centro (*hiro*) vs altura inferior radio pared (*hirp*), (f) altura superior radio centro (*hsro*) vs altura superior radio pared (*hsrp*)

NO es vs
es vs tiempo



En las gráficas (d), (e) y (f), se compara radialmente al centro (*ro*) y en la pared (*rp*) las cinéticas de temperatura junto con la temperatura de la cámara. Se puede observar en las gráficas (d) y (e), que prácticamente hasta las 108 horas, la temperatura en los puntos *hmro* y *hiro* fue mayor con respecto a *hmrp* y *hirp* (estos dos últimas con temperaturas promedio de 29 ± 0.94 y 28 ± 0.90 °C respectivamente), mientras que a tiempos posteriores las temperaturas fueron muy semejantes por lo que las cinéticas se sobreponen. En la gráfica (f) para los puntos *hsro* y *hsrp*, con una temperatura promedio de 29 ± 0.88 °C para el segundo punto. También se observa que hasta las 108 horas se tuvo el mayor gradiente de temperaturas, mientras que a tiempos posteriores el centro permaneció ligeramente más caliente que en la cercanía de la pared. Los gradientes radiales promedio de temperatura fueron: 0.02 °C/cm (*hiro-hirp*), 0.075 °C/cm (*hmro-hmrp*) y 0.11 °C/cm (*hsro-hsrp*).

Con respecto a la temperatura promedio exterior al reactor (*Temp cam*= 27 ± 0.61 °C) y la temperatura axial central promedio (29.04 ± 0.81 °C), se tuvo un incremento promedio de temperatura: de 2.04 °C. Empleando hongos blancos de putrefacción, Reid (1989) reportó que el calor metabólico generado (≈ 3 kJ/kg_{sop} h) durante procesos de delignificación en medio sólido y usando reactores tubulares (con condiciones de: 70% humedad y $\delta_{emp} = 0.15$ kg/L), pudo ser removido mediante aireación forzada (empleando aire con HR 100% y 1-1.5 VKGM), teniendo incrementos de temperatura de hasta 2.5 °C, cuyo valor es muy similar a los obtenidos durante este experimento. Así la aireación forzada en este tipo de configuración y para este proceso permitió mantener el control de temperatura en la fermentación.

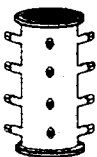


II. Cinéticas de temperatura en la producción de conidiosporas

En la *Figura 5.1.2*, se muestran las gráficas correspondientes a las cinéticas de temperatura durante la producción de conidiosporas. Las cinéticas se tomaron en seis diferentes puntos del reactor con la mayor relación longitud-diámetro ($L/D=4.8$). En las gráficas (a), (b) y (c), se comparan axialmente y en el centro (*ro*) las cinéticas a tres diferentes alturas (altura inferior *hi*, altura centro *hm* y altura superior *hs*), junto con la temperatura de la cámara de calentamiento (*Temp cam*).

Teniendo casi el mismo perfil, puede observarse que los puntos más calientes durante la fermentación volvieron a ser la altura media y superior, cuyas temperaturas promedios fueron 28.98 ± 0.94 y $28.8 \pm 1.07^\circ\text{C}$ respectivamente. El punto menos caliente se volvió a encontrar a la altura inferior, cuya temperatura promedio fue $28.16 \pm 0.78^\circ\text{C}$. Axialmente los gradientes promedio de temperaturas fueron: $0.034^\circ\text{C}/\text{cm}$ (*hiro-hmro*) y $0.008^\circ\text{C}/\text{cm}$ (*hmro-hsro*), por lo que en forma axial la parte central del reactor se mantuvo de manera isotérmica.

En las gráficas (d), (e) y (f), se compara radialmente al centro (*ro*) y en la pared (*rp*) las cinéticas de temperatura junto con la temperatura de la cámara. En las tres gráficas se observa que durante la fermentación, las temperaturas centrales (*ro*) son mayores a las de la pared (*rp*). Los gradientes radiales promedio de temperatura fueron: $0.15^\circ\text{C}/\text{cm}$ (*hiro-hirp*), $0.2^\circ\text{C}/\text{cm}$ (*hmro-hmrp*) y $0.16^\circ\text{C}/\text{cm}$ (*hsro-hsrp*), todos ellos mayores al máximo gradiente axial de $0.034^\circ\text{C}/\text{cm}$, teniendo a el punto *hmro* (centro del reactor) como el punto más caliente. Tomando en cuenta que el hongo *Beauveria bassiana* es de crecimiento lento, el calor metabólico generado durante la fermentación pudo ser



removido eficientemente en el sistema de reactores modulares mediante aireación forzada manteniendo prácticamente de manera isotérmica el proceso.

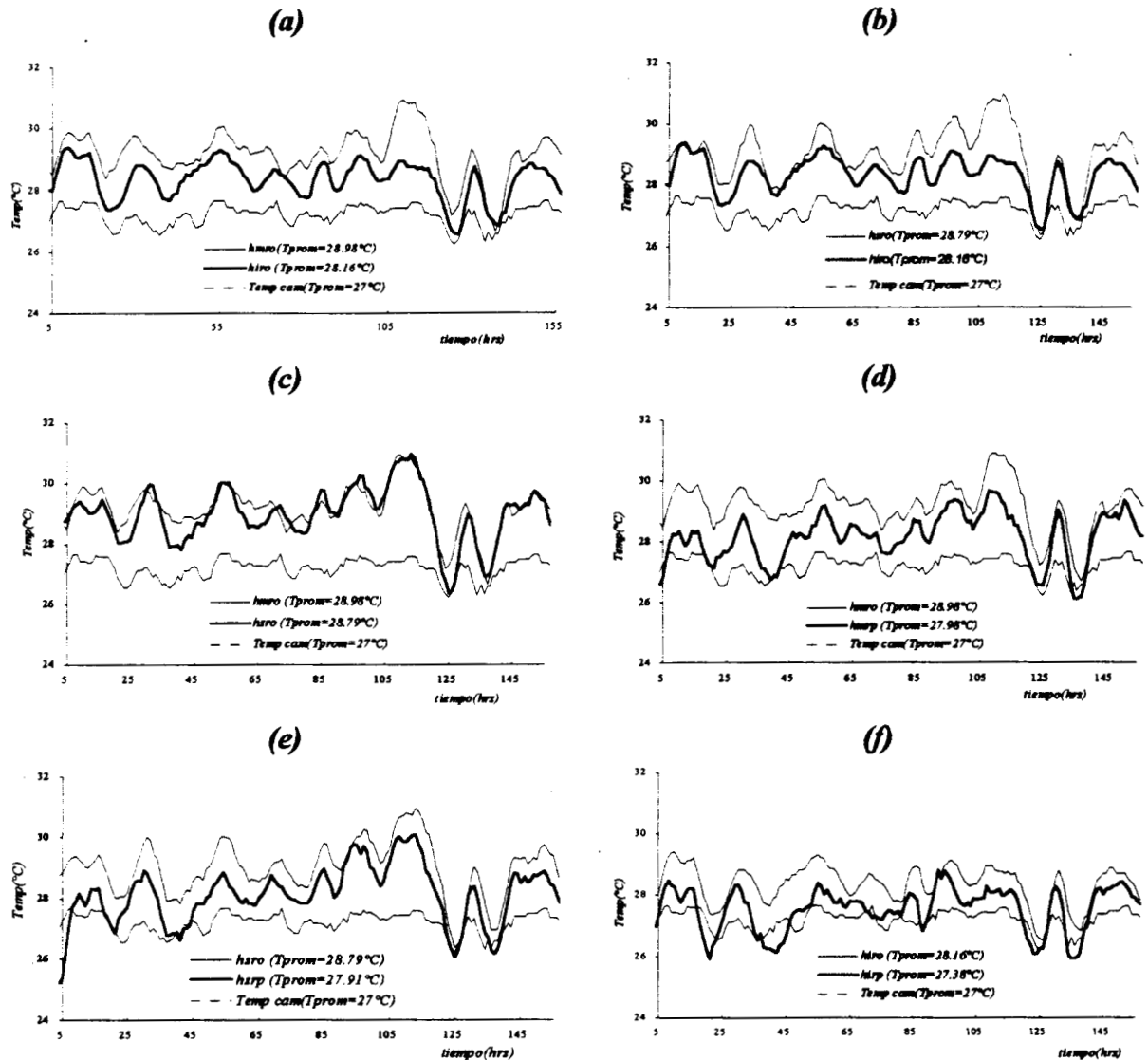
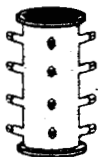


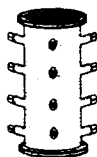
Fig 5.1.2 Cinéticas de Temperatura en la producción de conidiosporas, correspondientes al reactor con $L/D=4.8$. (a) altura inferior radio centro (*hiro*) vs altura media radio centro (*hmro*), (b) altura superior radio centro (*hsro*) vs altura inferior radio centro (*hiro*), (c) altura media radio centro (*hmro*) vs altura superior radio centro (*hsro*), (d) altura media radio centro (*hmro*) vs altura media radio pared (*hmro*), (e) altura superior radio centro (*hsro*) vs altura superior radio pared (*hsro*), (f) altura inferior radio centro (*hiro*) vs altura inferior radio pared (*hirp*).



III. Cinéticas de temperatura en la producción de mananastas

En la *Fig 5.1.3*, se muestran las gráficas correspondientes a las cinéticas de temperatura durante la producción de mananastas. A diferencia de las dos fermentaciones anteriores, las cinéticas mostradas fueron tomadas en tan sólo dos puntos (altura media-radio centro *hmro* y altura media radio pared *hmrp*), pero en tres diferentes configuraciones ($L/D=0.83$, $L/D=2.13$ y $L/D=5.09$). En las tres gráficas *a)*, *b)* y *c)* se observan claramente las diferencias de temperatura entre el centro, la pared y la temperatura externa al reactor.

Para el reactor con la relación $L/D=0.83$ (gráfica *a)*) y con respecto a la cinética de temperatura en el centro del reactor (*hmro*), se observa que a las 22 hrs de fermentación se alcanzó la temperatura máxima de 52°C , la cual se mantuvo hasta las 40 hrs; al término de este tiempo, la temperatura volvió a disminuir hasta alcanzar un mínimo de 42°C a las 60 hrs, para volver a aumentar y alcanzar un segundo máximo de 47°C a las 67 hrs. Estos dos máximos de temperatura, probablemente se debieron a un fenómeno de germinación-crecimiento-esporulación-germinación, es decir, el hongo durante su crecimiento al alcanzar la temperatura más alta y al encontrarse en condiciones desfavorables esporuló. A partir de este momento al ya no haber generación de calor metabólico, la temperatura en el centro del reactor empezó a disminuir, hasta el grado en el que las condiciones permitieron nuevamente la germinación y posterior crecimiento del hongo. En lo que respecta a la cinética en la cercanía de la pared (*hmrp*), se observa que la temperatura más alta que se alcanzó fue de 35°C esto alrededor de las 16 hrs, la cual se mantuvo mas o menos constante hasta el final de la fermentación. Para finalizar con el análisis de este reactor, se mencionara que las temperaturas promedio fueron:



47.4°C (*hmro*) y 35.9°C(*hmrp*), teniéndose un gradiente radial promedio de 1.06°C/cm y uno máximo de 1.71°C/cm.

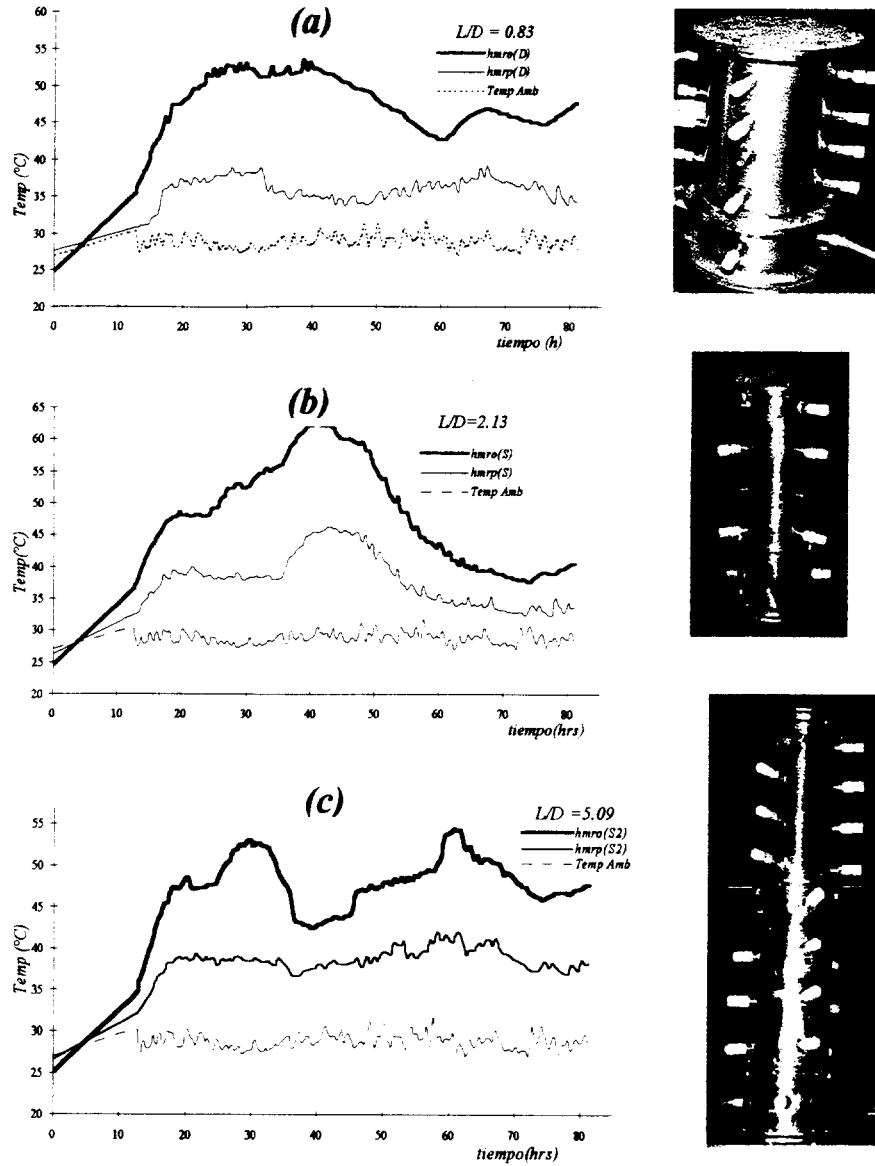
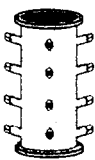
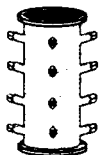


Fig 5.1.3 Cinéticas de temperatura en la producción de mananastas tomadas a la misma altura (*hm*) pero diferentes radios (*ro* y *rp*), junto con la temperatura de la cámara. (a) Cinéticas en el reactor con la configuración $L/D=0.83$, (b) Cinéticas en el reactor con la configuración $L/D=2.13$, (c) Cinéticas en el reactor con la configuración $L/D=5.09$.

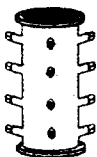


Para el reactor con la relación $L/D=2.13$ (gráfica (b)) y con respecto a la cinética de temperatura en el centro del reactor (*hmro*), se observa que alrededor de las 18 hrs se alcanzó una temperatura de 50°C , la cual se mantuvo hasta las 24-25hrs, para posteriormente aumentar, y alcanzar un máximo de temperatura de 63°C a las 41 hrs de fermentación, por lo que probablemente se haya presentado un fenómeno de germinación-crecimiento-esporulación-germinación. Por otra parte, para la cinética en la cercanía de la pared (*hmrp*), se observó un comportamiento similar al del centro; primero alrededor de las 18 hrs, se alcanzó una temperatura de $38-40^{\circ}\text{C}$, la cual se mantuvo hasta las 37 hrs, para que posteriormente se alcanzara un máximo de temperatura de 46°C a las 43 hrs, decayendo la temperatura hasta 35°C , la cual se mantuvo hasta el final del proceso. Cabe mencionar que para esta configuración, las temperaturas promedio fueron: 48°C (*hmro*) y 37.8°C (*hmrp*), teniéndose un gradiente radial promedio de $1.9^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ y uno máximo de $2.69^{\circ}\text{C}/\text{cm}$.

Finalmente, para el reactor con la mayor relación longitud-diámetro, $L/D=5.09$ (gráfica (c)) y con respecto a la cinética de temperatura en el centro del reactor (*hmro*), se pueden observar dos máximos de temperatura, uno casi a las 30 hrs e igual a 53°C y el otro alrededor de las 60 hrs e igual a 54°C . Nuevamente, los dos máximos que se presentaron, probablemente se deben a un fenómeno de germinación-crecimiento-esporulación-germinación. Por otra parte, para la cinética en la cercanía de la pared (*hmrp*), alrededor de las 16 hrs se alcanzó una temperatura de 38°C en promedio, la cual se mantuvo hasta el final de la fermentación. Cabe mencionar que para esta configuración, las temperaturas promedio fueron: 47.4°C (*hmro*) y 38.4°C (*hmrp*), teniéndose un gradiente radial promedio de $1.7^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ y uno máximo de $3.28^{\circ}\text{C}/\text{cm}$.



Basándose en el análisis hecho en las cinéticas de temperatura en la producción de las manananas, se puede notar lo siguiente: 1) En todas las configuraciones (relaciones L/D), siempre el centro del reactor fue el más caliente, llegando a inhibir la actividad fúngica, promoviendo así una rápida esporulación; 2) En general, las temperaturas alcanzadas en la cercanía de la pared en todos los reactores, se mantuvieron constantes y a una temperatura que permitió la actividad fúngica del hongo *Aspergillus oryzae*, sin llegar a inhibirlo; 3) En lo que respecta a los gradientes radiales de temperatura, Gutiérrez, (1995), empleando el hongo *Aspergillus niger* y Amberlita IRA-900 como soporte, durante la producción de ácido cítrico, reporta gradientes de temperatura radiales máximos de $3.1^{\circ}\text{C}/\text{cm}$, valor muy cercano a los obtenidos en el presente experimento; 4) Queda claro que la aireación forzada, no fue suficiente para poder mantener el control de temperatura, sin embargo debe hacerse resaltar que en el reactor con el mayor radio ($L/D=0.83$) en el cual se habrían esperado los gradientes radiales promedio y máximo mayores, fue el que presentó los valores correspondientes más bajos, esto debido probablemente a un mejor flujo, ya que el reactor presentó la mayor área transversal a éste.



5.1.2 Cinéticas de gases

En las diferentes configuraciones empleadas para cada una de las fermentaciones, el análisis de resultados se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Saucedo Castañeda (1994).

En primer lugar se presentan las cinéticas como %CO₂ y %O₂ a la salida de cada reactor; cabe señalar que los valores en la composición gaseosa fueron tomados en forma directa por el sistema de medición de gases desarrollado en la UAM-Iztapalapa (*Fig. 4.5.4*).

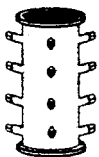
Posteriormente se muestran las cinéticas en forma de CO₂ producido y O₂ consumido como función del tiempo y por unidad en peso de soporte (mgCO₂/h g_{Msoport} y mgO₂/h g_{Msoport} respectivamente). Los valores en esta cinética pueden ser vistos como velocidades ó tasas de cambio, las cuales fueron estimadas a partir de la composición porcentual de los gases medidos y el flujo total a la salida de cada reactor. Las ecuaciones utilizadas fueron:

$$\Gamma_{CO_2} = \frac{dCO_2}{M_{sop} \cdot dt} \equiv \left[\frac{mgCO_2}{h \cdot g_{sop}} \right] = 60 \cdot \frac{Q_i \cdot f_{CO_2}}{W_{sop}} \left(\frac{P \cdot M_{CO_2}}{R \cdot T} \right) \text{-----} 5.1.1$$

$$\Gamma_{O_2} = -\frac{dO_2}{M_{sop} \cdot dt} \equiv \left[\frac{mgO_2}{h \cdot g_{sop}} \right] = 60 \cdot \frac{Q_i \cdot (0.21 - f_{O_2})}{W_{sop}} \left(\frac{P \cdot M_{O_2}}{R \cdot T} \right) \text{-----} 5.1.2$$

donde:

- $\Gamma_{CO_2} = \frac{dCO_2}{M_{sop} \cdot dt}$: Velocidad de producción del CO₂, por unidad en peso seco de soporte (mg CO₂/h g_{Msoport}).

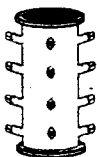


- $\Gamma_{O_2} = -\frac{dO_2}{M_{sop}} \cdot dt$: Velocidad de consumo de O_2 , por unidad en peso seco de soporte ($mg\ O_2/h\ g_{Msop}$).
- Q_i : Flujo total a la salida del reactor al tiempo t_i (ml/min)
- f_{CO_2} : Fracción de CO_2 corregido a la salida del fermentador (% $CO_2/100$)
- f_{O_2} : Fracción de O_2 corregido a la salida del fermentador (% $O_2/100$)
- W_{sop} : Peso total del soporte seco (g_{Msop})
- M_{CO_2}, M_{O_2} : Pesos moleculares del CO_2 (44 g/mol) y O_2 (32 g/mol) respectivamente.
- R : Constante de los gases ideales (0.082 atm L/mol °K)
- P : Presión atmosférica a la altura de la Ciudad de México (592 mm Hg)
- T : Temperatura del flujo a la salida del reactor (°K)

Considerando que el área bajo la curva en las gráficas correspondientes a las velocidades, representan el CO_2 producido ó el O_2 consumido por unidad en peso seco de soporte, se continúa mostrando gráficas de $mgCO_2prod/g_{Msop}$ y mgO_2cons/g_{Msop} . Para poder estimar estos valores y así construir sus gráficas, se utilizó el método del trapecio (**Fig. 5.1.4**).

De esta manera el CO_2 y O_2 totales por unidad en peso seco de soporte, se estimaron mediante las expresiones 5.1.3 y 5.1.4.

$$A_{tot\ CO_2} = \frac{mg \cdot totCO_2}{g_{Msop}} = \sum_{i=0}^n [\Gamma_{CO_2i} + \Gamma_{CO_2i+1}] \cdot \frac{(t_{i+1} - t_i)}{2} \text{-----} 5.1.3$$



$$A_{tot\ O_2} = \frac{mg \cdot totO_{2\ tot}}{g_{Msop}} = \sum_{i=0}^n [\Gamma_{O_{2i}} + \Gamma_{O_{2i+1}}] \cdot \frac{(t_{i+1} - t_i)}{2} \text{----- 5.1.4}$$

donde:

- $A_{tot\ CO_2}$, $A_{tot\ O_2}$: Áreas totales bajo las curvas de las velocidades de producción de CO_2 y consumo de O_2 respectivamente.
- $\Gamma_{CO_{2i}}$, $\Gamma_{CO_{2i+1}}$: Velocidades de CO_2 producidos por unidad en peso seco de soporte a los tiempos t_i y t_{i+1} .
- $\Gamma_{O_{2i}}$, $\Gamma_{O_{2i+1}}$: Velocidades de O_2 consumidos por unidad en peso seco de soporte a los tiempos t_i y t_{i+1} .

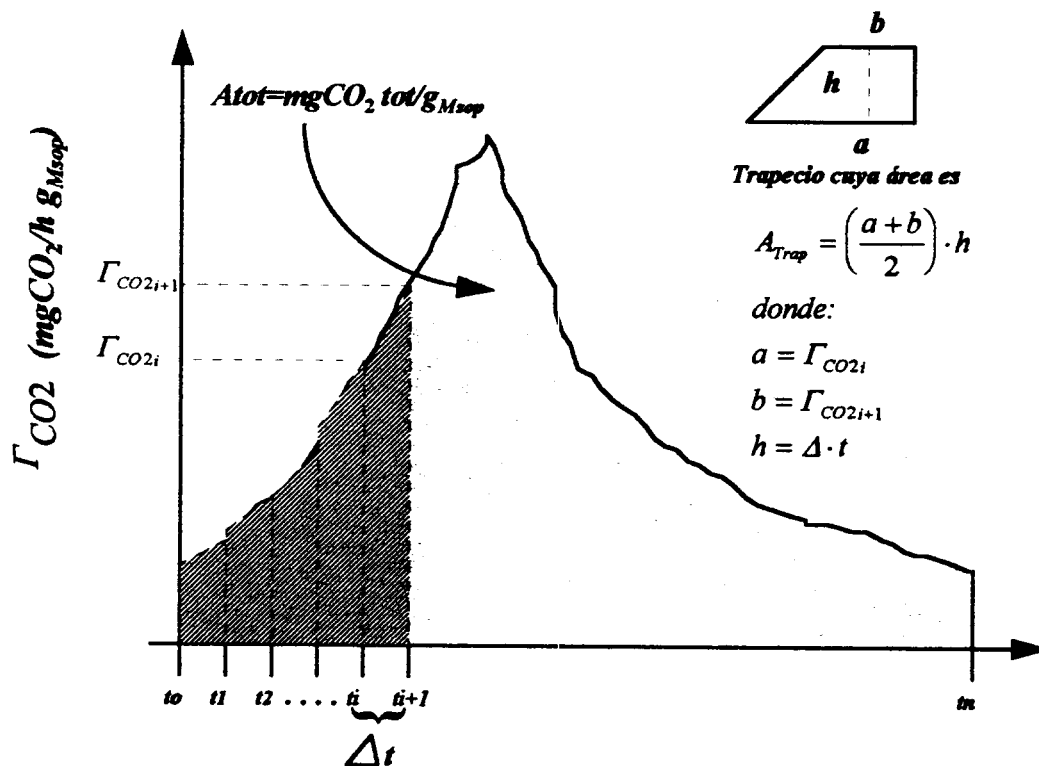
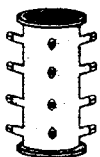


Fig 5.1.4 Método del trapecio, empleado para la determinación del CO_2 producido y O_2 consumido totales por unidad en peso seco de soporte durante las diferentes fermentaciones.



Finalmente en tablas y para cada una de las configuraciones empleadas, se presentan los valores de $mgtotCO_2/gMsop$ y $mgtotO_2/gMsop$, así como coeficientes respiratorios globales, los cuales fueron estimados mediante la expresión:

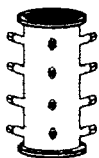
$$CR_{global} = \frac{Atot_{CO_2}}{Atot_{O_2}} \left(\frac{M_{O_2}}{M_{CO_2}} \right) = \frac{mmol \cdot totCO_2}{mmol \cdot totO_2} \text{-----} 5.1.5$$

Donde M_{CO_2} y M_{O_2} son los pesos moleculares respectivos, en mg/mmol.

I. Cinéticas de gases en la producción de fenol-oxidasa.

En la *Fig 5.1.5*, se muestran de manera porcentual las cinéticas de gases a la salida de los diferentes reactores durante la producción de fenol-oxidasa. Para el reactor con la menor relación longitud-diámetro ($L/D=0.7$), y con respecto a la evolución de CO_2 (gráfica (a)), alrededor de las 35 horas se alcanzó el más alto porcentaje (1%), el cual se mantuvo hasta las 70 horas de fermentación, para posteriormente disminuir a 0.1%, manteniéndose así hasta el final de la fermentación. En lo que respecta al O_2 consumido (gráfica (b)), a las 60 horas se alcanzó un mínimo de 19.2%, para posteriormente aumentar hasta un 20.65-20.7%, manteniéndose así hasta el final de la fermentación. Debe hacerse notar que la mayor actividad metabólica se tuvo en las primeras 150 horas.

Para el reactor con la configuración $L/D=2.13$ (gráficas (c) y (d)), durante las primeras horas de la fermentación, se observan para el CO_2 y O_2 un máximo (1.05%) y mínimo (19%) respectivamente. Recordando que *Streptomyces cyaneus*, se inóculo en forma de biomasa a partir de un cultivo líquido y en su fase de crecimiento, estos valores extremos probablemente se deban a una alta actividad microbiana en la cual se consumió el extracto de levadura sobrante, que era la única fuente de carbono-nitrogeno de fácil consumo. A tiempos posteriores para el CO_2 se observan dos máximos: 0.45% a las 35



horas y 0.5% a las 65 horas; después de estos máximos el CO₂ disminuye hasta un 0.1% manteniéndose así hasta el final de la fermentación. Para el O₂ se observan tres mínimos: 20.2% a las 65 horas, 20.45% a las 100 horas y 20.5% a las 130 horas. Al igual que en el anterior reactor, la máxima actividad se tuvo hasta las 150 horas de fermentación.

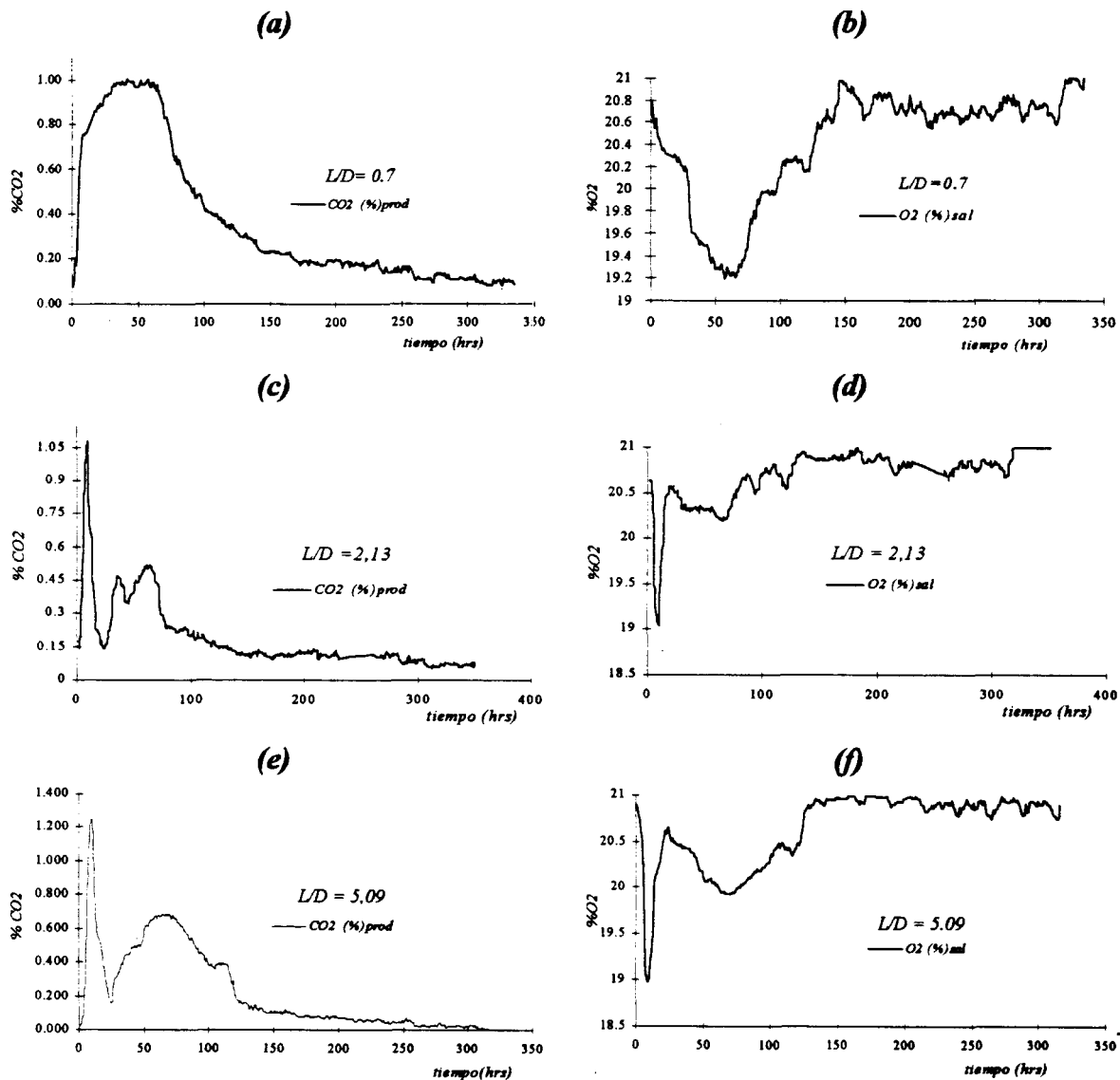
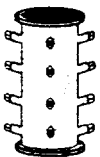


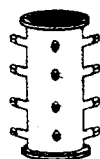
Fig 5.1.5. Gráficas porcentuales de CO₂ producido y O₂ consumido a la salida de los reactores en las diferentes configuraciones probadas durante la producción de fenol-oxidasa. (a) y (b) % CO₂ y O₂ para L/D=0.7; (c) y (d) %CO₂ y O₂ para L/D=2.13; (e) y (f) %CO₂ y O₂ para L/D=5.09.



En lo que se refiere al último reactor con la configuración $L/D=5.09$ (gráficas (e) y (f)), durante las primeras horas de fermentación se vuelve a observar un máximo (1.225%) y mínimo (18.95%) para el CO_2 y O_2 , los cuales probablemente se deban a la razón antes mencionada, es decir la actividad microbiana debida al consumo del extracto de levadura sobrante. A tiempos posteriores para el CO_2 , se observa claramente un máximo (0.65%) a las 65 horas; después el CO_2 disminuyó hasta un 0.075% manteniéndose así hasta el final de la fermentación. Para el O_2 se observa un mínimo (19.8%) a las 65 horas, posteriormente el O_2 aumentó hasta un 20.75% manteniéndose hasta el final del proceso. De manera similar a los anteriores reactores, la máxima actividad se tuvo hasta las 150 horas de fermentación.

Durante el proceso de producción de la fenol-oxidasa (sin tomar en cuenta los máximos y mínimos debidos al consumo del extracto de levadura), se observa que el reactor que presentó el mayor porcentaje de CO_2 producido (1%) y en consecuencia de O_2 consumido (19.2%), fue el que tuvo la menor relación longitud-diámetro ($L/D=0.7$). Yang (1994), empleando microorganismos del género *Streptomyces* para la producción de oxytetraciclina a partir de residuos de cáscara de papa en procesos de fermentación sólida con reactores tubulares, reporta producciones de CO_2 que van del 1 hasta 3% y consumos de O_2 de 19.3 hasta 17.7%.

En la *Fig 5.1.6*, se muestran las velocidades de producción de CO_2 y consumo de O_2 para cada una de las configuraciones probadas durante la producción de fenol-oxidasa. Puede observarse que para las relaciones $L/D=2.13$ y $L/D=5.09$, a las primeras horas de la fermentación se presentan máximos tanto para el CO_2 y O_2 , esto se explica nuevamente por el consumo del extracto de levadura sobrante; fuera de esto el reactor



que presenta las más altas tasas de cambio, vuelve a ser el de la menor relación longitud - diámetro.

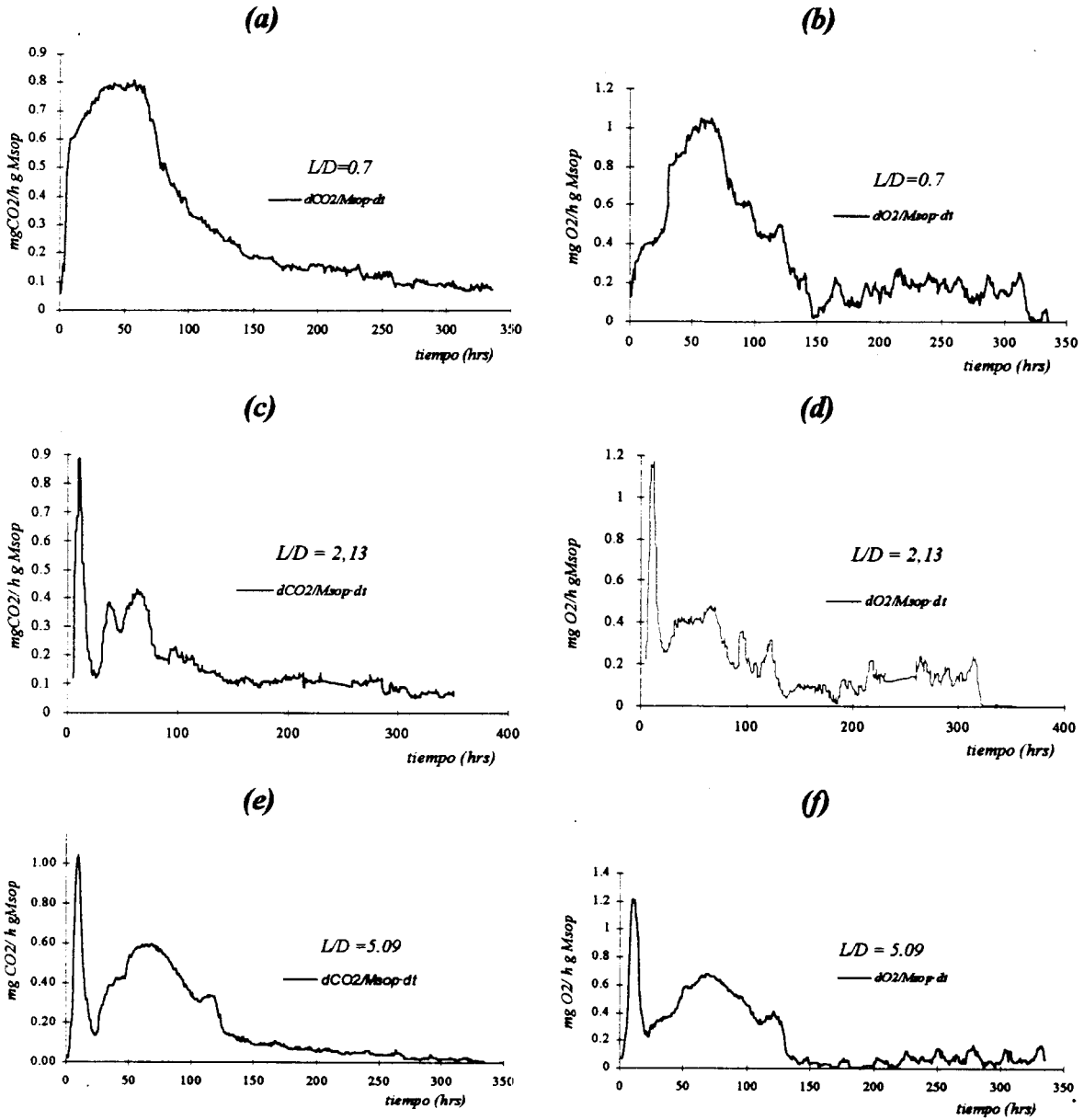
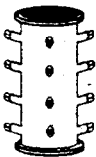


Fig 5.1.6. Gráficas para las tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ para las diferentes configuraciones probadas durante la producción de fenol-oxidasa. (a) y (b) mgCO₂/h gMsop y mgO₂/h gMsop L/D=0.7; (c) y (d) mgCO₂/h gMsop y mgO₂/h gMsop L/D=2.13; (e) y (f) mgCO₂/h gMsop y mgO₂/h gMsop L/D=5.09.



En la Fig. 5.1.7, se muestran las gráficas de $\text{mgCO}_2/\text{gMsop}$ y $\text{mgO}_2/\text{gMsop}$ durante la producción de fenol-oxidasa.

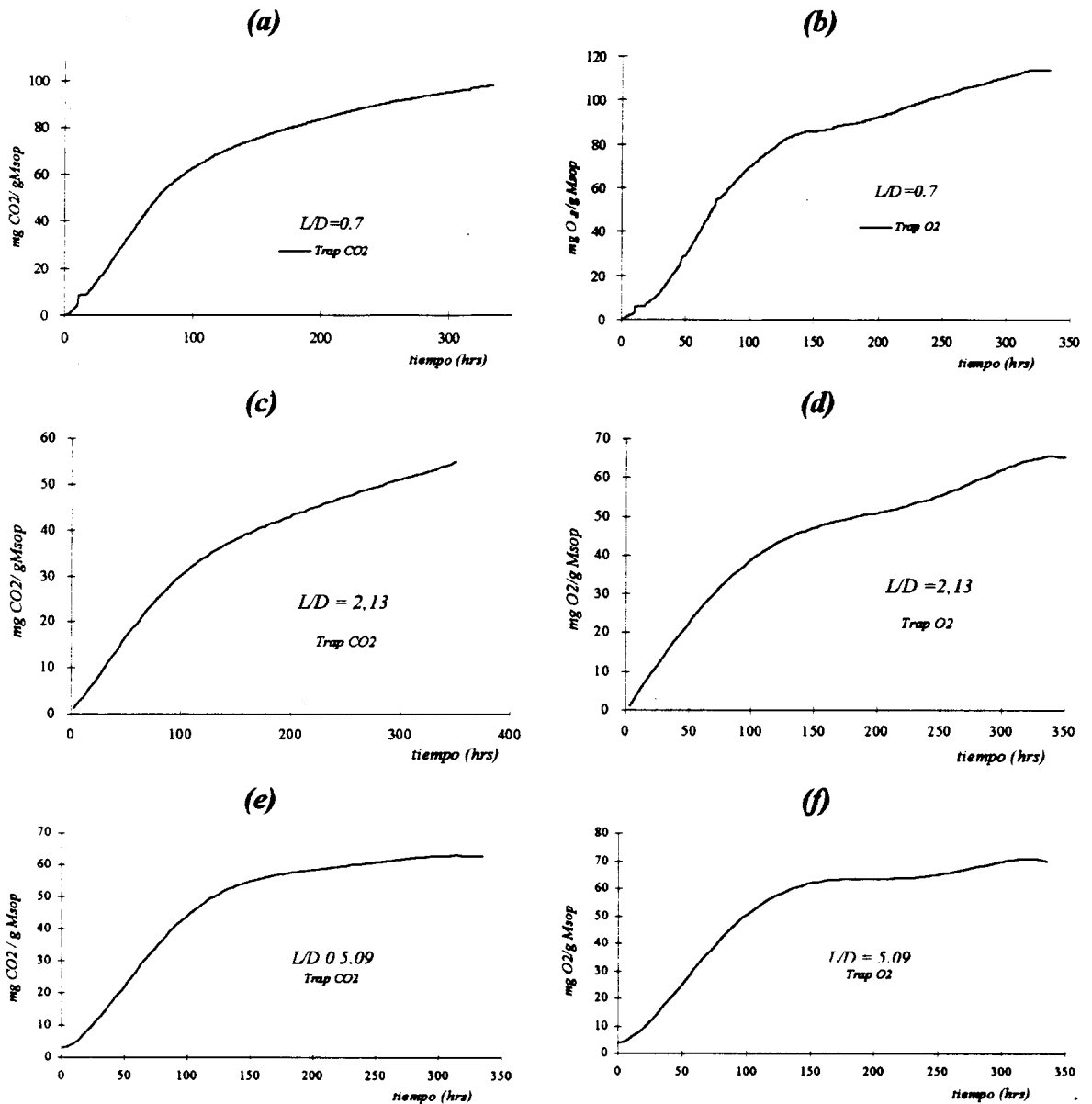
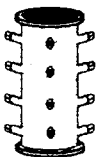


Fig 5.1.7. Gráficas de $\text{mgCO}_2/\text{gMsop}$ y $\text{mgO}_2/\text{gMsop}$, para las diferentes configuraciones probadas durante la producción de fenol-oxidasa. (a) y (b) $L/D=0.7$; (c) y (d) $L/D=2.13$; (e) y (f) $L/D=5.09$.



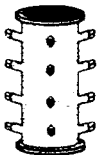
En la **Tabla 5.1.1**, se muestran los valores de CO₂ y O₂ totales por unidad en peso seco de soporte, así como los coeficientes respiratorios globales para cada una de las configuraciones empleadas durante la producción de fenol-oxidasa.

<i>L/D</i>	<i>mgtotCO₂/gMsop</i>	<i>mgtotO₂/gMsop</i>	<i>C.R._{global}</i>
0.7	98	114	0.63
2.13	54	65	0.61
5.09	63	72	0.64

Se ha demostrado que la presencia de oxígeno es fundamental para estimular la síntesis de las enzimas necesarias para el proceso de delignificación (Hatakka, 1983; Levonen, 1985; Kamra, 1986), por lo que una buena aireación es fundamental para que se pueda llevar este fenómeno. Basándose en lo anterior, debe hacerse notar que los flujos aplicados a los reactores fueron: 2.1 L/min ($L/D=0.7$), 2 L/min ($L/D=5.09$) y 0.9 L/min ($L/D=2.13$), es así que los reactores con los flujos más altos, fueron los que presentaron la mayor producción de CO₂ y consumo de O₂.

Durante un proceso de delignificación, en teoría se producen un promedio 0.27 mgCO₂/gMsop h (Reid, 1989), de acuerdo a esto, se esperaría para los experimentos realizados en un total de: (0.27 mg CO₂/gMsop h) X (336 h fermentación)= 90.72 mg CO₂/gMsop al final de la fermentación. Comparando este valor con los mostrados en la **Tabla 5.1.1**, puede observarse que en promedio los resultados experimentales no se encuentran tan lejanos al teórico.

Finalmente en lo que respecta a los coeficientes respiratorios, para el proceso de delignificación se tiene un valor teórico de 0.75 (Beaudin, 1996). Comparando este valor con lo que se observa en la **Tabla 5.1.1**, los valores experimentales se encuentran por debajo del teórico, lo cual indica que se tuvo un alto consumo de oxígeno, esto debido



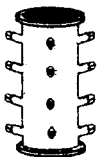
probablemente a que el inóculo se agregó en su etapa de crecimiento, con lo cual hubo una alta tasa en el consumo de oxígeno.

II. Cinéticas de gases en la producción de conidiosporas.

En la *Fig 5.1.8*, se muestran de forma porcentual las cinéticas de gases a la salida de los diferentes reactores durante la producción de conidiosporas. Para el reactor con la menor relación longitud-diámetro ($L/D=1.2$), y con respecto a la evolución de CO_2 (gráfica (a)), alrededor de las 25 horas se alcanzó un máximo de 0.8%, para posteriormente disminuir a 0.15%, manteniéndose así hasta el final de la fermentación. En lo que respecta al O_2 consumido (gráfica (b)), a las 24 horas se alcanzó un mínimo de 20.09%, para posteriormente aumentar hasta un 20.95%, manteniéndose así hasta el final de la fermentación.

Para el reactor con la configuración $L/D=2.4$ (gráficas (c) y (d)), a las 25 horas de fermentación, se observan para el CO_2 y O_2 un máximo (1.15%) y mínimo (19.1%) respectivamente. A tiempos posteriores el CO_2 disminuye hasta un 0.15%, mientras que el O_2 aumenta hasta un 20.9%, manteniéndose ambos así hasta el final de la fermentación.

En lo que se refiere al último reactor con la configuración $L/D=4.8$ (gráficas (e) y (f)), a las 35 horas de fermentación se presentan nuevamente un máximo (0.9%) y mínimo (19.8%) para el CO_2 y O_2 respectivamente. A tiempos posteriores el CO_2 disminuyó hasta un 0.15%, mientras que el O_2 aumentó hasta un 20.9%, manteniéndose así ambos hasta el final del proceso.



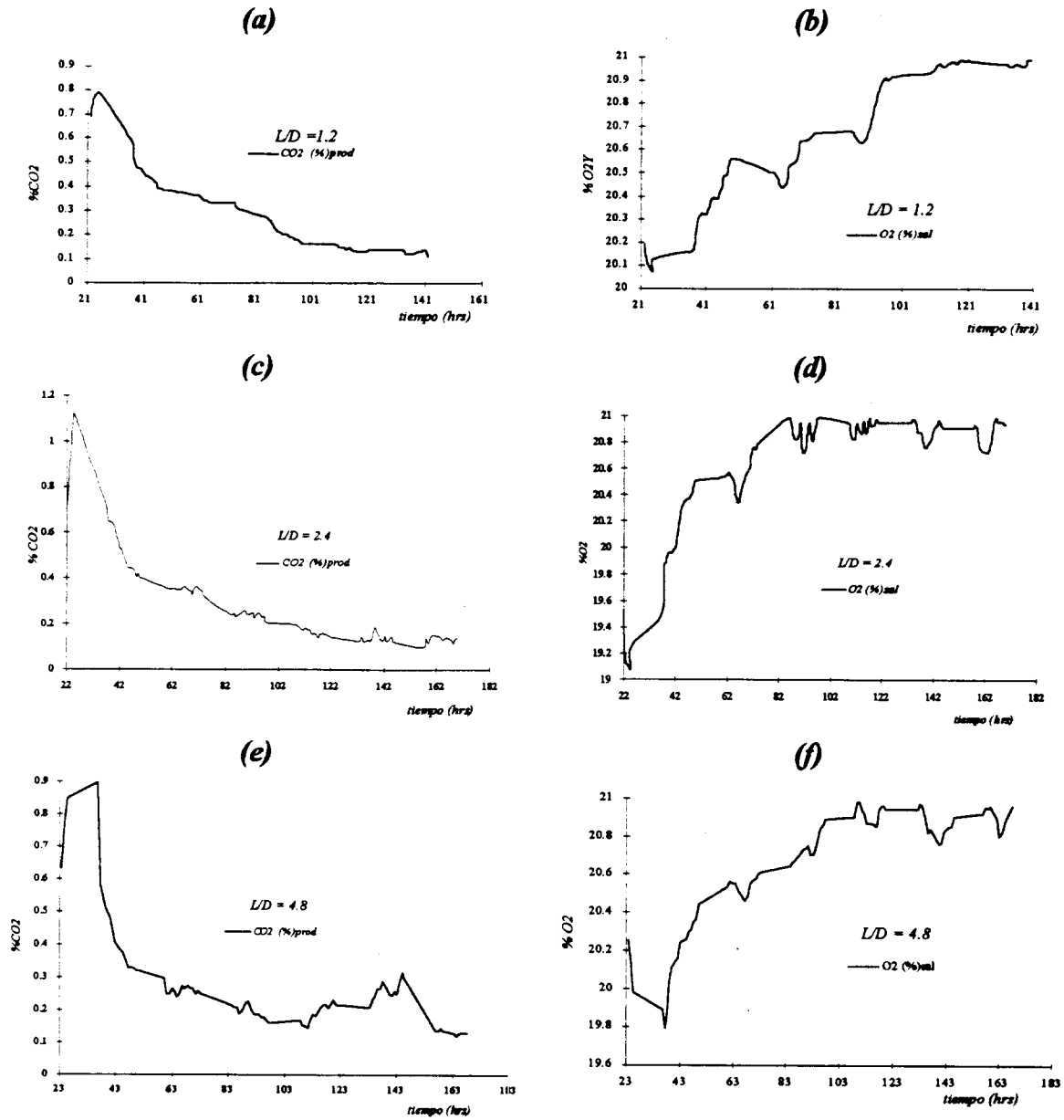
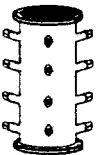


Fig 5.1.8. Gráficas porcentuales de CO₂ producido y O₂ consumido a la salida de los reactores en las diferentes configuraciones probadas durante la producción de conidiosporas. (a) y (b) % CO₂ y O₂ para $L/D=1.2$; (c) y (d) %CO₂ y O₂ para $L/D=2.4$; (e) y (f) %CO₂ y O₂ para $L/D=4.8$.

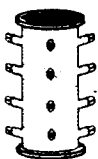


Durante el proceso de producción de conidiosporas, se observa que el reactor que presentó el mayor porcentaje de CO₂ producido y en consecuencia de O₂ consumido fue el que tuvo la relación longitud-diámetro $L/D=2.4$.

Por otra parte los reactores con las alturas menores es decir con las configuraciones L/D de 1.2 y 2.4 presentaron sus máximos en la producción de CO₂ y mínimos en el consumo de O₂ a la misma hora (25 hrs), mientras que el reactor de doble módulo ($L/D=4.8$), es decir el de mayor altura presentó estos valores extremos a un tiempo posterior (35 hrs), lo cual seguramente se debió a una posterior germinación del inóculo presente en el módulo superior.

Debe hacerse notar que en todos los casos se tuvo la mayor actividad microbiana dentro de las primeras 100 horas de fermentación. En todos los casos, el comportamiento observado en las primeras horas del proceso estuvo asociado a la fase exponencial de crecimiento del hongo, esto hasta que se alcanzaron los valores extremos en la producción y consumo de CO₂ y O₂ (25-35hrs). Posteriormente, vino una etapa de menor actividad, la cual fue disminuyendo a medida que fue consumiéndose el sustrato aún presente, y que duro aproximadamente hasta las 40-50 horas de fermentación. A partir de este momento y hasta las 100 horas, puede suponerse que es cuando se presentó la mayor tasa de esporulación del hongo.

Posteriormente a las 100 horas, el CO₂ producido y O₂ consumido en promedio se mantuvieron constantes hasta el final de la fermentación, esto debido probablemente a la actividad del micelio remanente, pues anteriormente a esta etapa prácticamente ya se habría llevado a cabo la formación de la mayor parte de las conidiosporas.



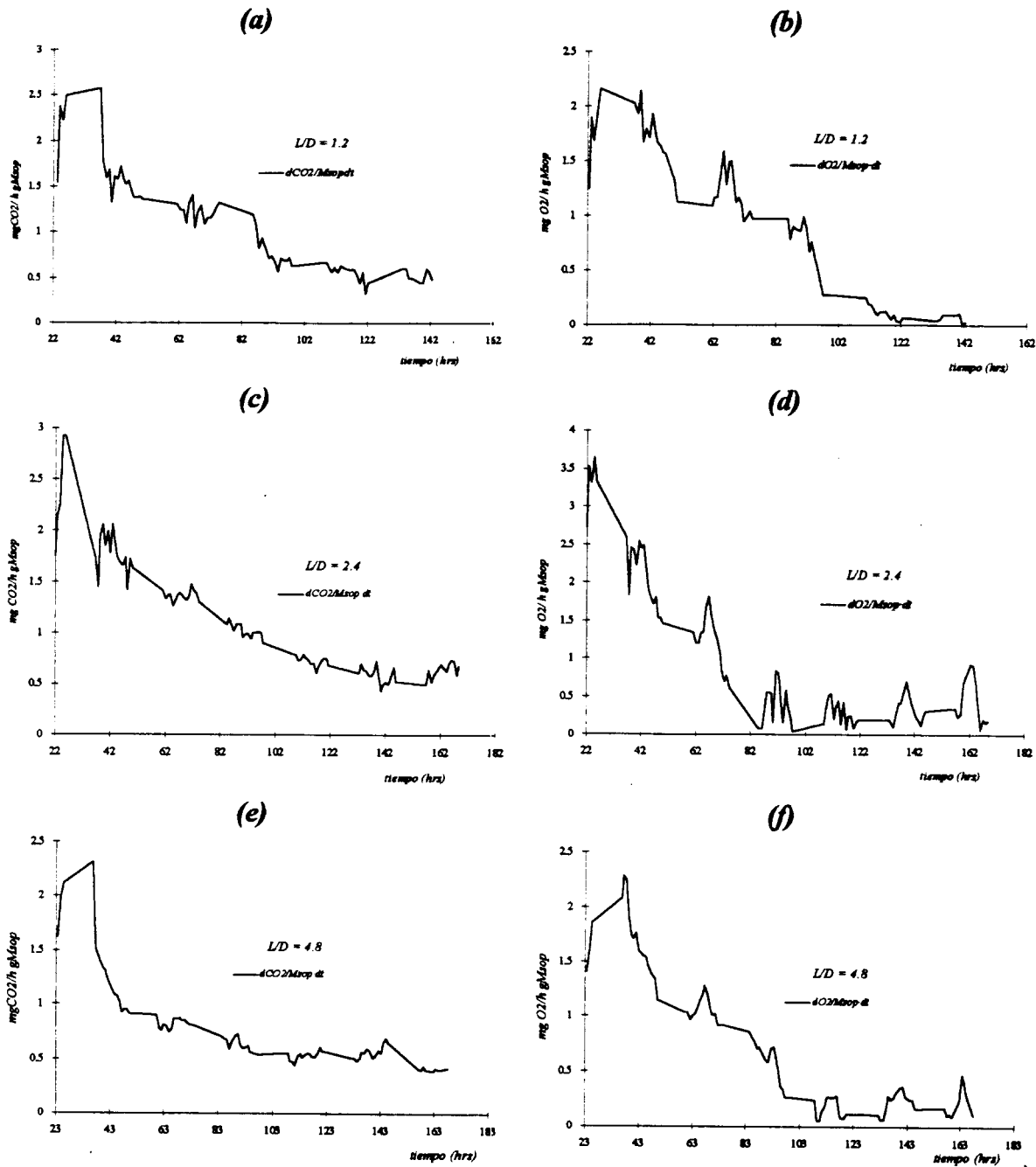
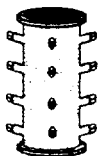


Fig 5.1.9. Gráficas para las tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ para las diferentes configuraciones probadas durante la producción conidiosporas. (a) y (b) mgCO₂/h gMsop y mgO₂/h gMsop L/D=1.2; (c) y (d) mgCO₂/h gMsop y mgO₂/h gMsop L/D=2.4; (e) y (f) mgCO₂/h gMsop y mgO₂/h gMsop L/D=4.8.

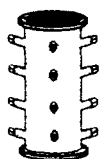


En la *Fig 5.1.10*, se muestran las velocidades de producción de CO₂ y consumo de O₂ para cada una de las configuraciones probadas durante la producción de conidiosporas. Para todas las configuraciones, a las primeras horas de la fermentación se presentaron máximos para el CO₂ y O₂ a los mismos tiempos que en las gráficas de porcentaje, con un comportamiento similar al descrito con anterioridad. El reactor que presentó las más altas tasas de cambio, volvió a ser el de la relación longitud-diámetro $L/D=2.4$.

En la *Fig 5.1.11*, se muestran las gráficas de mgCO₂/gMsop y mgO₂/gMsop durante la producción de conidiosporas, mientras que en la *Tabla 5.1.2* se muestran los valores de CO₂ y O₂ totales por unidad en peso de soporte, así como los coeficientes respiratorios globales para cada una de las configuraciones empleadas.

<i>L/D</i>	<i>mgtotCO₂/gMsop</i>	<i>mgtotO₂/gMsop</i>	<i>C.R._{global}</i>
1.2	130	105	0.90
2.4	165	130	0.93
4.8	112	102	0.80

A partir de la tabla, se observa que el reactor en el que se tuvo la mayor producción de CO₂ y consumo de O₂ fue el de la relación $L/D=2.4$. Para cada una de los reactores se tuvo en forma aproximada 140 mg glucosa/gMsop como sustrato inicial, siendo este la única fuente de carbono y energía. Estequiométricamente, por cada miligramo de CO₂ producido se consumen 0.68 miligramos de glucosa. En promedio se tuvo una producción de 135 ± 26 mgtotCO₂/gMsop, es decir que en promedio 92 mg glucosa/gMsop, se emplearon en el proceso respiratorio. Si suponemos que toda la glucosa fue utilizada, entonces poco menos del 35% del sustrato fue empleado para formación de micelio y esporas.



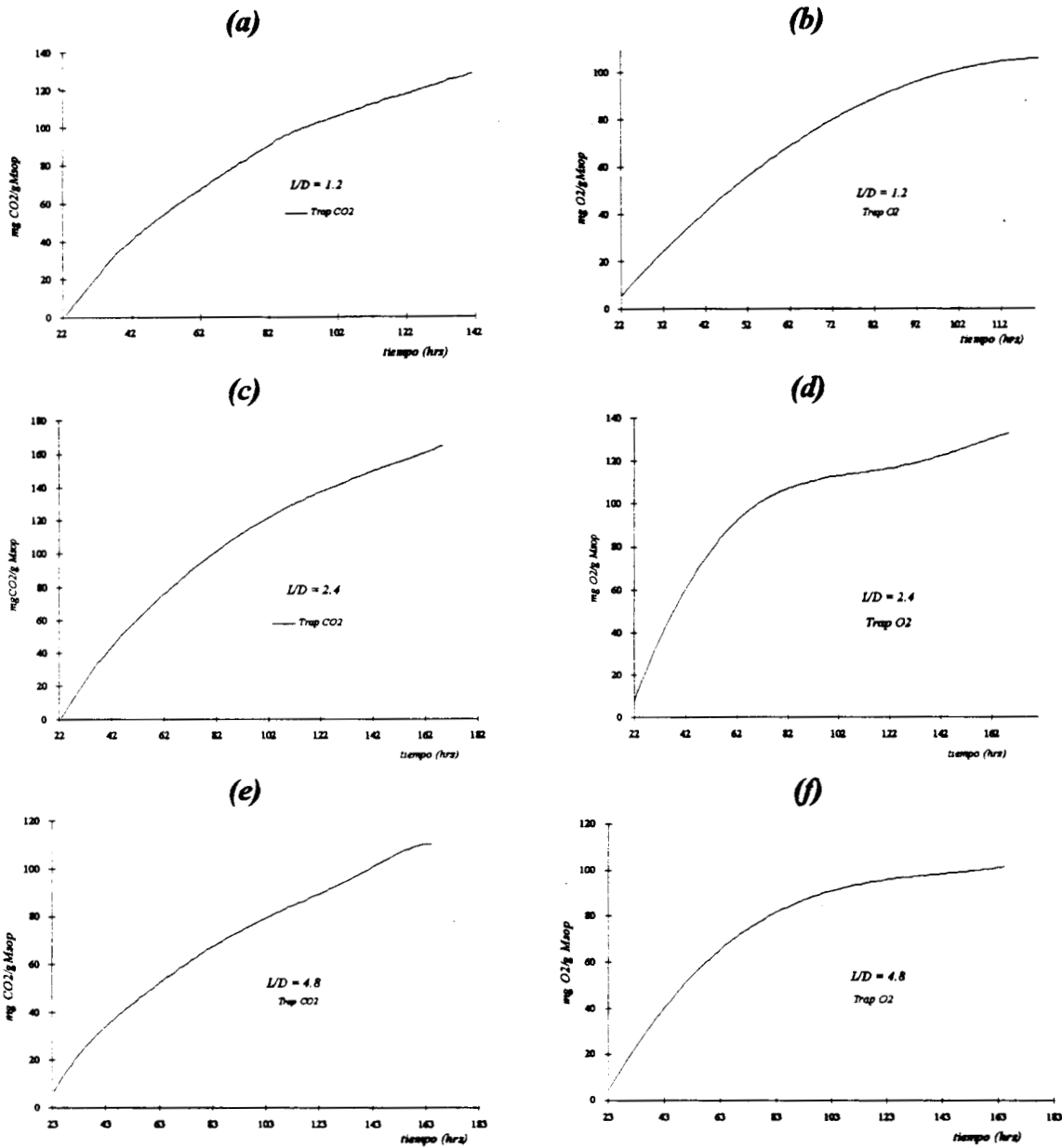
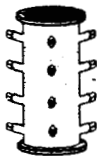


Fig 5.1.10. Gráficas de mgCO₂/gMsop y mgO₂/gMsop, para las diferentes configuraciones probadas durante la producción de conidiosporas. (a) y (b) L/D=1.2; (c) y (d) L/D=2.4; (e) y (f) L/D=4.8.



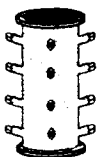
La menor utilización del sustrato para la producción de micelio, es explicada basándose en la composición del medio sintético y en particular a la relación C/N la cual fue de 75:1. La producción de conidiosporas de *Beauveria bassiana*, se ve favorecida cuando se emplea glucosa como única fuente de carbono-energía (Thomas,1987) y bajo condiciones limitantes en la fuentes de fósforo y/o nitrógeno (Hegedus,1990).

Por otra parte para procesos aerobios con glucosa como única fuente de carbono-energía, el coeficiente respiratorio tiene un valor teórico de 1. De acuerdo a los valores mostrados en la *Tabla 5.1.2*, se tuvo un coeficiente promedio de 0.88 ± 0.07 , valor muy próximo al teórico, lo cual indica que los cultivos se llevaron en condiciones aerobicas adecuadas.

III. Cinéticas de gases en la producción de mananastas.

En la *Fig 5.1.11*, se muestran de forma porcentual las cinéticas de gases a la salida de los diferentes reactores durante la producción de mananastas. Para el reactor con la menor relación longitud-diámetro ($L/D=0.83$), y con respecto a la evolución de CO_2 (gráfica (a)), se presentaron dos máximos bien definidos: el primero alrededor de las 24 horas alcanzando un valor de 9.8% y el segundo alrededor de las 53 horas alcanzando un valor de 8.4%. En lo que respecta al O_2 consumido (gráfica (b)), también se presentaron dos mínimos a los mismos tiempos con valores de 12% y 13% respectivamente.

Para el reactor con la configuración $L/D=2.13$ (gráficas (c) y (d)), también se presentaron dos máximos bien definidos en la evolución del CO_2 , ambos a los mismos tiempos que en el reactor anterior (24 y 53) horas con valores de 6% y 8% respectivamente. De la misma manera y en lo que respecta al O_2 consumido, se volvieron



a presentar dos mínimos en los mismos tiempos pero con valores de 15% y 13% respectivamente.

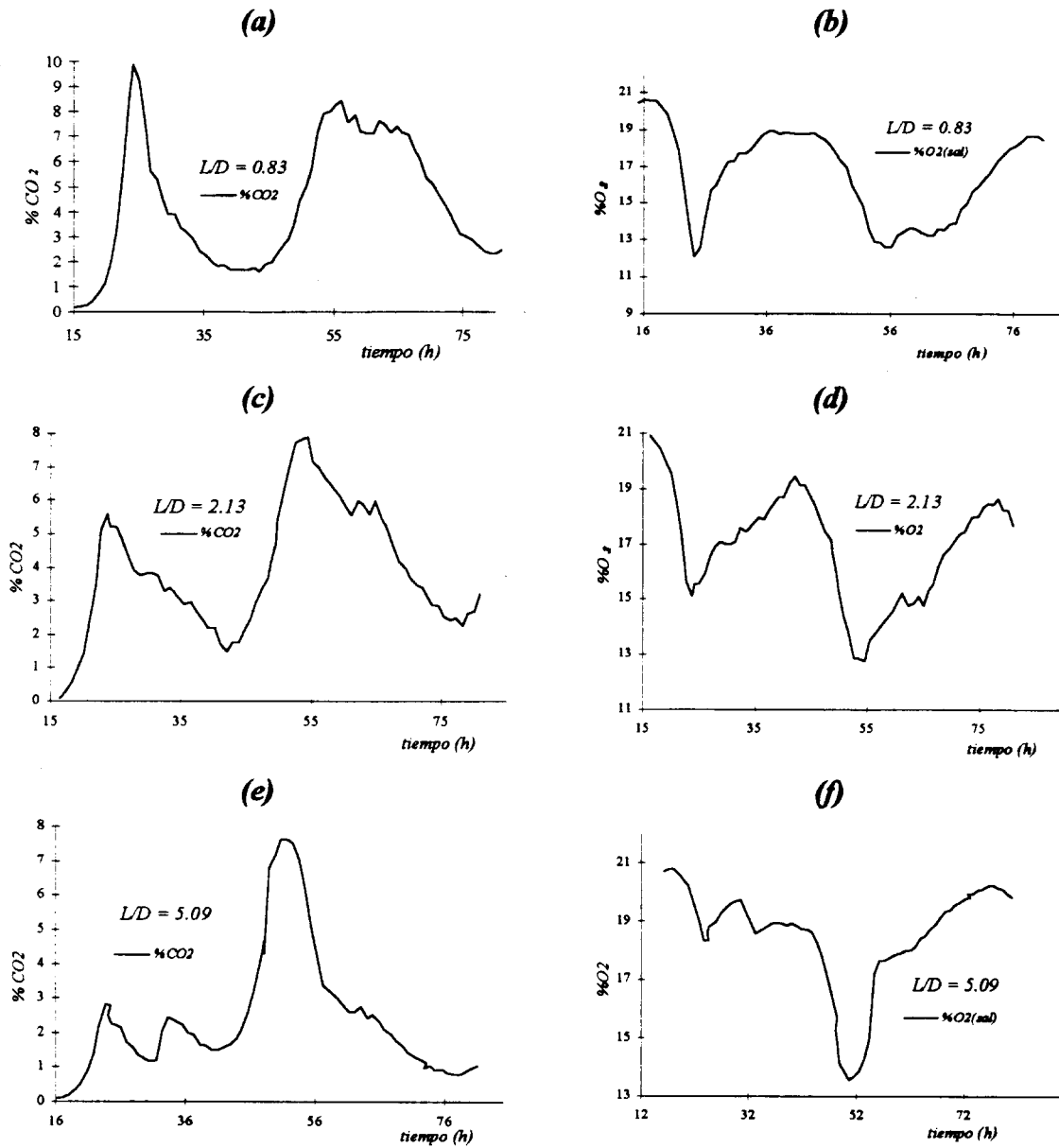
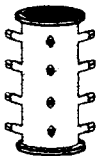


Fig 5.1.11. Gráficas porcentuales de CO₂ producido y O₂ consumido a la salida de los reactores en las diferentes configuraciones probadas durante la producción de manzanas. (a) y (b) % CO₂ y O₂ para L/D=0.83; (c) y (d) %CO₂ y O₂ para L/D=2.13; (e) y (f) %CO₂ y O₂ para L/D=5.09.

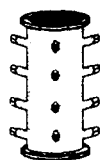


Para el último reactor con la configuración $L/D=5.09$ (gráficas (e) y (f)), y en lo que se refiere a la producción de CO_2 , se presentaron tres máximos, dos de ellos alrededor de los mismos tiempos que los anteriores casos (24 y 53 horas) con valores de 2.8% y 7.6% respectivamente; mientras que el tercer máximo se encontró en un tiempo intermedio de 34 horas con valor de 2.5%. En lo que se refiere al consumo de O_2 , y de manera semejante, se presentaron tres valores mínimos a los mismos tiempos, cuyos valores en forma ascendente de acuerdo al tiempo fueron: 18.5%, 19% y 13.5%.

Nótese que a diferencia de los cultivos anteriores (con *S. cyaneus* y *B. Bassiana*), al emplearse *Aspergillus oryzae* la producción y consumo de CO_2 y O_2 además de que fue significativamente más alta, se llevó en tiempo mucho mas cortos, lo cual indica claramente una tasa de crecimiento mayor de este hongo con respecto a los microorganismos anteriormente empleados.

Relacionando el hecho de la alta tasa de crecimiento y sabiendo que muchos residuos agrícolas tales como la pasta de copra (los cuales contienen de un 30-50% de celulosa y de un 20-40% de hemicelulosa, Deschamps, 1985) es una fuente rica de carbohidratos de fácil consumo (mediante la hidrólisis de los polisacáridos presentes), puede entenderse la alta producción y consumo de CO_2 y O_2 , hecho relacionado sin duda alguna al gran calor metabólico generado.

Por otra parte, la baja remoción del calor debido por: 1) la baja conductividad del material fermentado; 2) la poca eficiencia del proceso de aireación (remoción convectiva); trajo como consecuencia altos incrementos en la temperatura; una condición de estrés que origino la rápida esporulación. Sin embargo, al descender la temperatura las condiciones fueron nuevamente favorables, presentándose nuevamente la



germinación y crecimiento, dando lugar a un proceso cíclico que explica los múltiples máximos y mínimos observados en las cinéticas de gases.

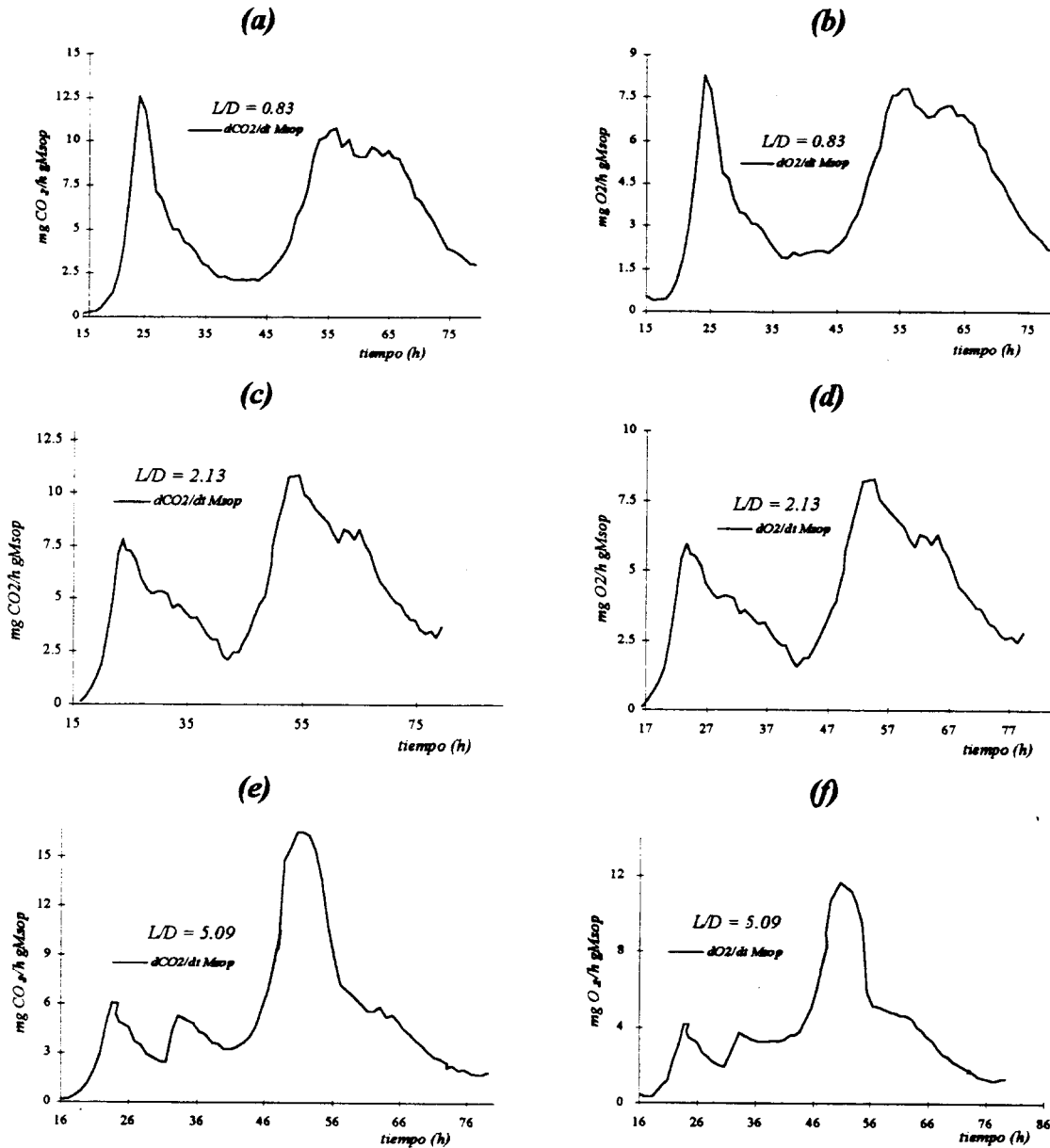
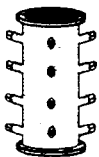


Fig 5.1.12. Gráficas para las tasas de producción de CO_2 y consumo de O_2 para las diferentes configuraciones probadas durante la producción de manzana. (a) y (b) $\text{mgCO}_2/\text{h gMsop}$ y $\text{mgO}_2/\text{h gMsop}$ $L/D=0.83$; (c) y (d) $\text{mgCO}_2/\text{h gMsop}$ y $\text{mgO}_2/\text{h gMsop}$ $L/D=2.13$; (e) y (f) $\text{mgCO}_2/\text{h gMsop}$ y $\text{mgO}_2/\text{h gMsop}$ $L/D=5.09$.

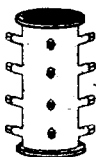


En la *Fig. 5.1.12*, se muestran las velocidades de producción de CO₂ y consumo de O₂ para cada una de las configuraciones probadas durante la producción de mananasas. Para todas las configuraciones, se presenta un comportamiento similar y con valores extremos a las mismos tiempos que en las gráficas de porcentaje presentando con anterioridad.

En la *Fig. 5.1.13*, se muestran las gráficas de mgCO₂/gMsop y mgO₂/gMsop durante la producción de mananasas. Obsérvese el comportamiento sinoidal de las curvas, debido al fenómeno cíclico de esporulación. En la *Tabla 5.1.3* se muestran los valores de CO₂ y O₂ totales por unidad en peso de soporte, así como los coeficientes respiratorios globales para cada una de las configuraciones empleadas.

<i>L/D</i>	<i>mgtotCO₂/gMsop</i>	<i>mgtotO₂/gMsop</i>	<i>C.R._{global}</i>
0.83	363	271	0.98
2.13	353	270	0.95
5.09	336	250	0.98

En promedio se tuvo una producción de 351±14 mgtotCO₂/gMsop. Suponiendo que el 70% del peso seco del sustrato-soporte está constituido por celulosa y hemicelulosa (Deschamps 1985), y ya que estos polisacáridos proporcionan mediante hidrolisis enzimática las hexosas (glucosa y sus isómeros como manosas, xilosa, arabinosa etc, todas ellas con fórmula empírica C₆H₁₂O₆), capaces de ser utilizados como fuentes de carbono y energía, de cada gramo de soporte se tendrían 0.7 g de sustrato fácilmente disponible. Estequiométricamente, por cada gramo de CO₂ producido se habrían consumido 0.68 gramos sustrato-soporte. De acuerdo a la producción de CO₂, en promedio fueron consumidos 239 mg sustrato/gMsop para el proceso respiratorio.



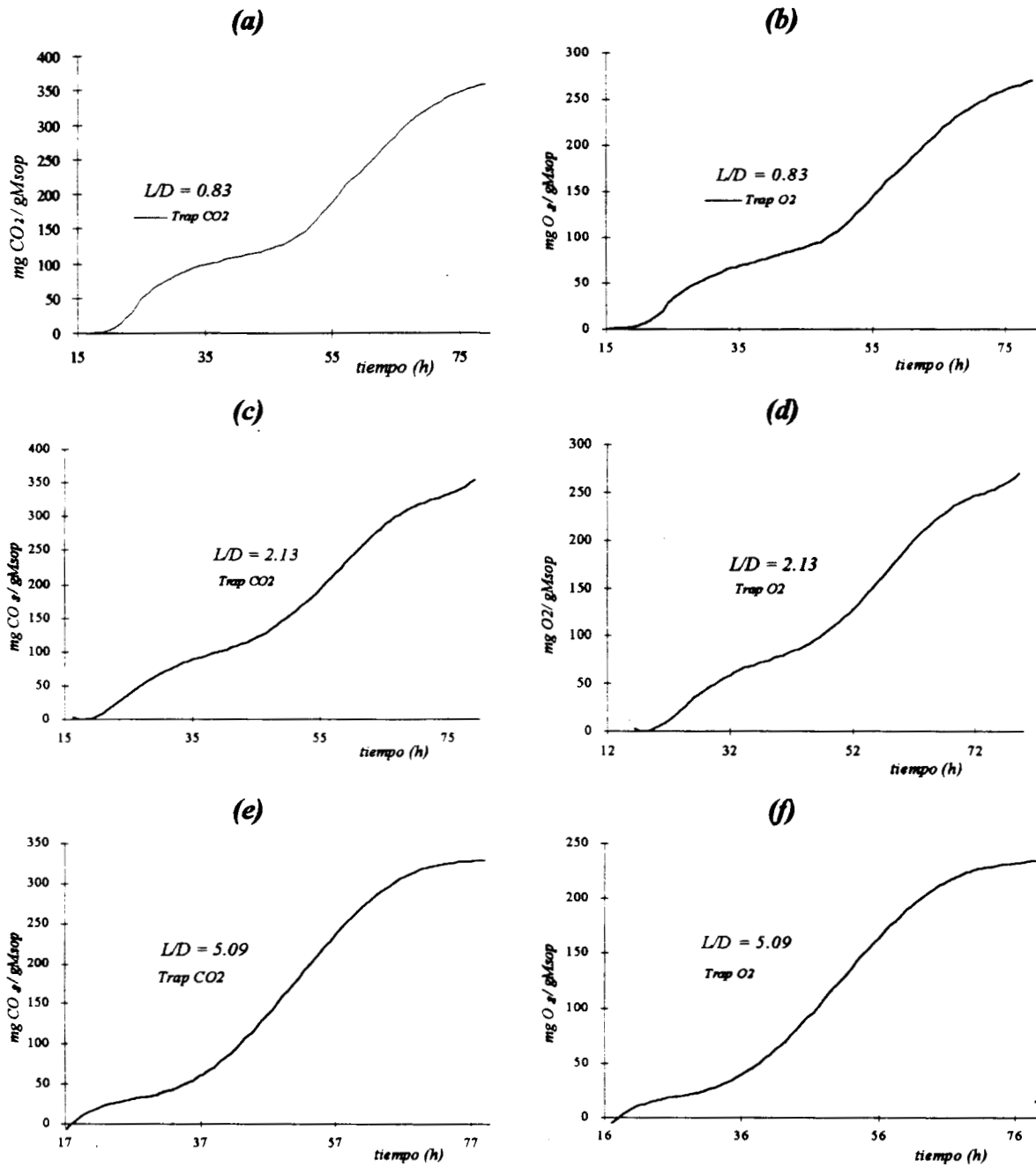
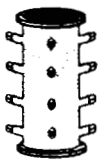


Fig 5.1.13. Gráficas de mgCO₂/gMsop y mgO₂/gMsop, para las diferentes configuraciones probadas durante la producción de mananasas. (a) y (b) $L/D=0.83$; (c) y (d) $L/D=2.13$; (e) y (f) $L/D=5.09$.



Finalmente, para procesos aeróbicos con hexosas tales como la glucosa, podemos considerar que el coeficiente respiratorio tiene un valor teórico de 1. De acuerdo a los valores mostrados en la *Tabla 5.1.3*, se tuvo un coeficiente promedio de 0.97 ± 0.017 , valor muy próximo al teórico, lo cual indica que los cultivos se llevaron en condiciones aeróbicas adecuadas.

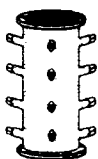
5.2 Perfiles axiales

En esta sección, se presentan las gráficas y análisis correspondientes a los perfiles axiales de las principales variables para cada una de las configuraciones. Debe hacerse notar que todos los perfiles fueron determinados hasta el final en cada una de las fermentaciones.

5.2.1. Perfiles axiales en la producción de fenol-oxidasa

Enseguida, se presentan los perfiles axiales correspondientes al proceso de producción de fenol-oxidasa a partir de *Streptomyces cyaneus*.

En la *Fig 5.2.1*, se muestran los perfiles axiales de humedad. La fermentación se comenzó con una humedad del 80%. Para todas las configuraciones, puede observarse lo siguiente: 1) La humedad inicial prácticamente se conserva en la parte inferior (3 y 9 cm) tanto en el centro como en la parte cercana a la pared; 2) A medida que aumentó la altura del reactor, la humedad disminuyó; 3) El gradiente radial de humedad, fue aumentando con la altura del reactor, siendo siempre mayor la humedad en la cercanía de las paredes de los reactores que en sus centros. El principal descenso se presentó en la sección superior (51 cm) del reactor con la relación $L/D=5.09$ (gráfica (c)), el cual fue del 9% con respecto a la humedad inicial. Aunque los reactores fueron alimentados mediante



aireación forzada en la parte inferior empleando aire humidificado a la temperatura del proceso, aparentemente se presentó un fenómeno de arrastre debido probablemente a la falta de saturación del aire de proceso.

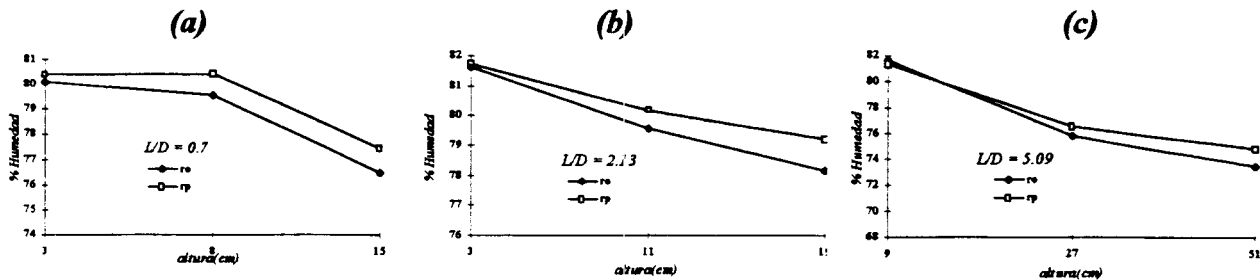


Fig 5.2.1. Perfiles axiales de humedad en la producción de fenol-oxidasa para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.7$; (b) $L/D=2.13$; (c) $L/D=5.09$.

Por otra parte, en la Fig 5.2.2 se muestran los perfiles axiales de actividad de agua. En todas las configuraciones, se observa un comportamiento similar al de la humedad, sin embargo los cambios son menores del 4% con respecto al valor más alto de a_w para cada reactor. Para una gran variedad de materiales empleados como soportes-sustratos en procesos de fermentación sólida y con humedades que varían de un 30-85%, se ha visto una relación no lineal entre la humedad y la a_w , en donde altos cambios de humedad traen pequeños cambios en la a_w (Oriol, 1988; Grajek, 1987).

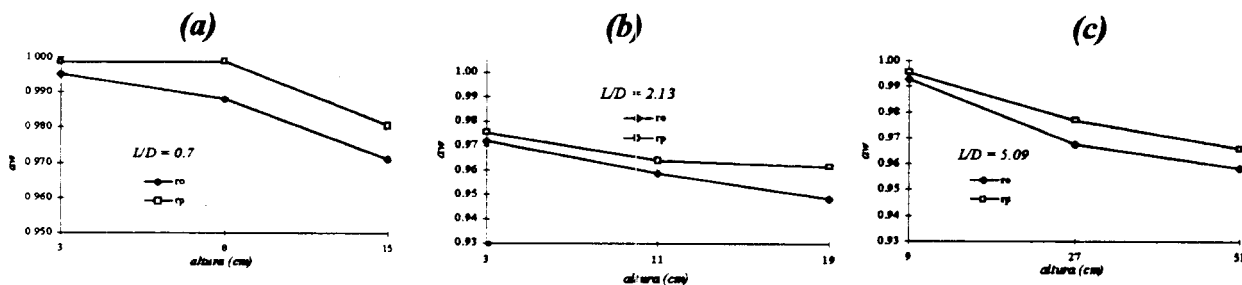
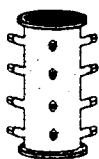


Fig 5.2.2. Perfiles axiales de actividad de agua en la producción de fenol-oxidasa para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.7$; (b) $L/D=2.13$; (c) $L/D=5.09$.



Para el pH, los perfiles axiales se muestran en la *Fig 5.2.3*. Al principio de la fermentación este fue de 6.6. Aunque las variaciones de pH fueron pequeñas con respecto al inicial (recordemos que el pH es una función logarítmica de la concentración de iones H_3O^+ , en la cual una variación de una unidad representa un cambio de 10 veces la concentración original, sin embargo en este caso las variaciones fueron menores a un vigésimo con respecto al inicial), puede observarse que para todos los reactores hubo un incremento en la parte inferior, mientras que en las secciones media y superior de los mismos el pH se mantuvo prácticamente sin cambio. También se observa un gradiente radial de pH, siendo mayor este en la parte inferior. En todos los perfiles el pH del centro fue menor que el correspondiente a la cercanía de la pared. La variación de pH, con respecto al inicial, probablemente se debió al empleo de compuestos orgánicos con grupos aminos presentes en el extracto de levadura, los cuales al ser desaminados para su uso durante el crecimiento, ocasionaron el aumento de pH (Cooney,1981).

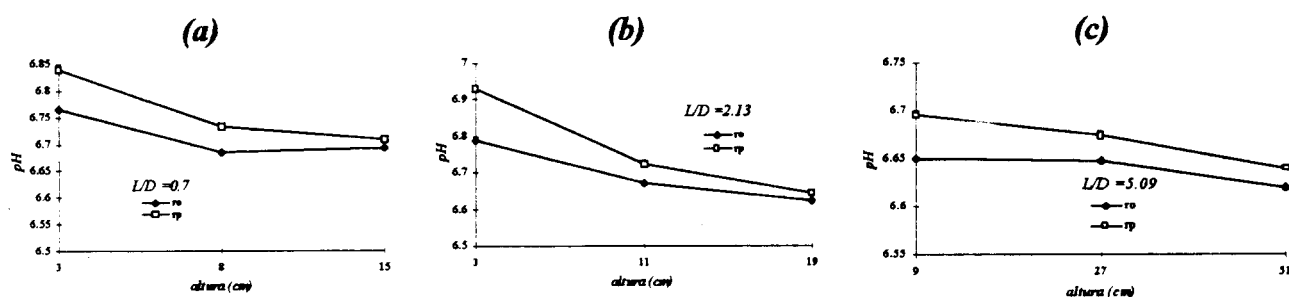
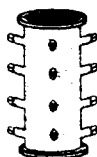


Fig 5.2.3.Perfiles axiales de pH en la producción de fenol-oxidasa para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.7$; (b) $L/D=2.13$; (c) $L/D=5.09$

En lo que se refiere a la proteína soluble por gramo en peso seco de soporte-sustrato (μg proteína/g.p.s), los perfiles axiales se muestran en la *Fig 5.2.4*. Hay que hacer notar que este tipo de proteína, está directamente relacionada con las enzimas extracelulares empleadas por el actinomiceto *S. cyaneus*, durante el proceso de



delignificación (por otra parte hay que recordar que la proteína no soluble, se relaciona en forma directa con la formación de biomasa). Para las configuraciones $L/D=0.7$ (gráfica (a)) y $L/D=2.13$ (gráfica (b)) se observa: 1) La proteína soluble prácticamente se mantuvo constante a lo largo de los reactores, teniéndose valores muy semejantes en ambos; 2) La proteína soluble fue ligeramente mayor en el centro de los reactores que en la periferia. Por otra parte para el reactor con la configuración $L/D=5.09$ (gráfica (c)), hubo un descenso de la proteína soluble al aumentar la altura, sin embargo los valores en la sección media y superior de este son muy similares al de los anteriores reactores.

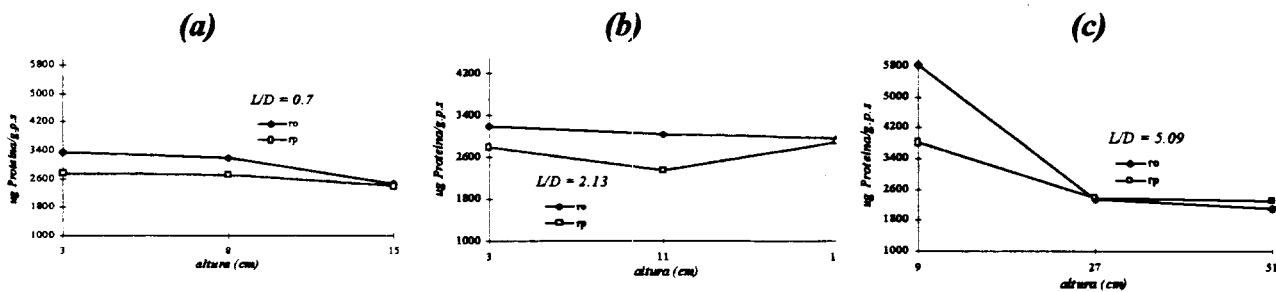
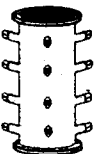


Fig 5.2.4. Perfiles axiales de μg proteína/g.p.s en la producción de fenol-oxidasa para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.7$; (b) $L/D=2.13$; (c) $L/D=5.09$

Para la actividad por gramo en peso seco de soporte (mU/g.p.s), en la Fig 5.2.5, se muestran los perfiles axiales correspondientes. En los reactores con las configuraciones $L/D=0.7$ (gráfica (a)) y $L/D=2.13$ (gráfica (b)), la actividad permanece prácticamente constante al ir aumentando la altura, siendo ligeramente mayor en la periferia que en el centro. En lo que respecta al reactor con la configuración $L/D=5.09$ (gráfica (c)), el perfil de actividad en la periferia se comporta en forma similar a los anteriores, mientras que el perfil central mostró un incremento con la altura del reactor.



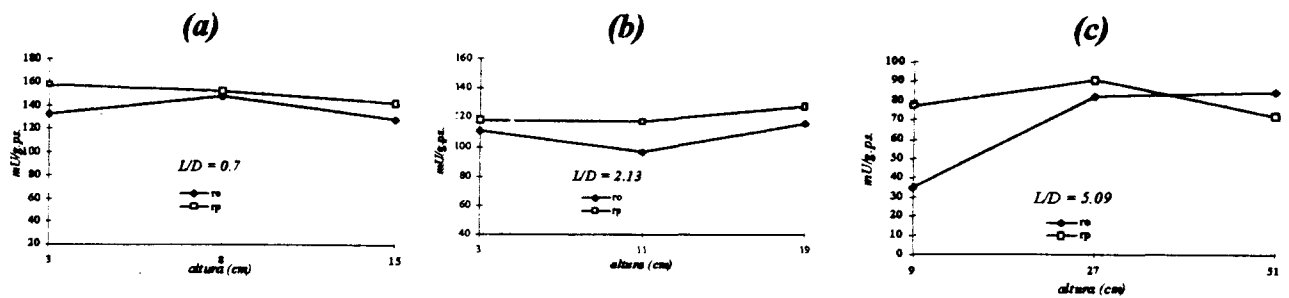


Fig 5.2.5. Perfiles axiales de actividad por gramo en peso seco de soporte (mU/g.p.s) en la producción de fenol-oxidasa para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.7$; (b) $L/D=2.13$; (c) $L/D=5.09$

Finalmente en la Fig. 5.2.6, se muestran los perfiles axiales de actividad específica (mU/mg proteína soluble). Estos perfiles se construyeron mediante el cociente de la actividad por gramo en peso seco de soporte y la proteína soluble por gramo en peso seco de soporte. Para el reactor con la configuración $L/D=0.7$ (gráfica (a)), el perfil en la cercanía de la pared muestra que la actividad específica se comportó de manera constante con respecto a la altura, mientras que el perfil central presentó un ligero incremento con la altura. En el reactor con la configuración $L/D=2.13$ (gráfica (b)), los perfiles central y de la periferia, muestran que la actividad se mantuvo constante con respecto a la altura. Por último, el reactor con la relación $L/D=5.09$ (gráfica (c)) para ambos perfiles, mostró un incremento de la actividad específica con respecto a la altura del reactor.

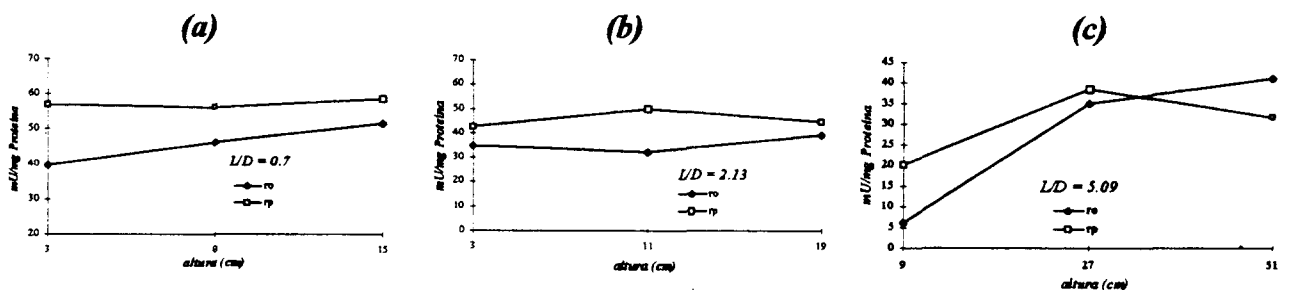
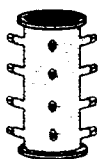


Fig 5.2.6. Perfiles axiales de actividad específica (mU/mg proteína) en la producción de fenol-oxidasa para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.7$; (b) $L/D=2.13$; (c) $L/D=5.09$



5.2.2. Perfiles axiales en la producción de conidiosporas

A continuación, se presentan los perfiles axiales correspondientes al proceso de producción de conidiosporas a partir de *Beuaveria bassiana*. Debe mencionarse que los perfiles se determinaron sólo para las configuraciones que presentaron las dos mayores relaciones longitud-diámetro.

Para la humedad, los perfiles axiales se muestran en la **Fig 5.2.7**. Al inicio de la fermentación la humedad fue del 75%. En la figura puede observarse claramente que hubo un fenómeno de condensación en ambos reactores, siendo más marcado en las secciones inferiores de estos. Esto indica que hubo un mal control de la temperatura del aire saturado con que se alimentaba a los reactores, siendo mayor a la temperatura del proceso. Debido a este mismo fenómeno se explica por que la humedad fue disminuyendo a medida que aumentaba la altura.

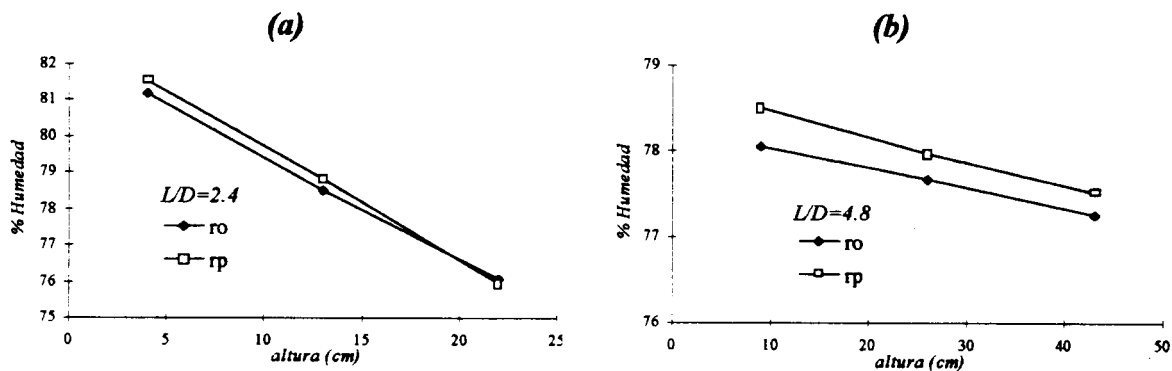
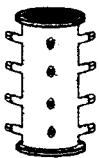


Fig 5.2.7. Perfiles axiales de humedad en la producción de conidiosporas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=2.4$; (b) $L/D=4.8$

Por otra parte, para la actividad de agua los perfiles axiales se presentan en la **Fig 5.2.8**. Aunque en ambos gráficos, se observa una disminución de la a_w a medida que aumenta la altura de los reactores, la variación es menor a un centésimo (menos del 0.1%



con respecto a la a_w más alta para cada reactor). Los valores tan altos de a_w , seguramente son debidos a las altas humedades alcanzadas al final de la fermentación, originadas estas por el fenómeno de condensación. Un problema que puede presentarse en procesos de cultivos en estado sólido cuando se trabaja con altos valores de humedad y por consiguiente de a_w , es la contaminación por otros microorganismos tales como bacterias y levaduras, pues los requerimientos de a_w de estos son mayores que el de los hongos.

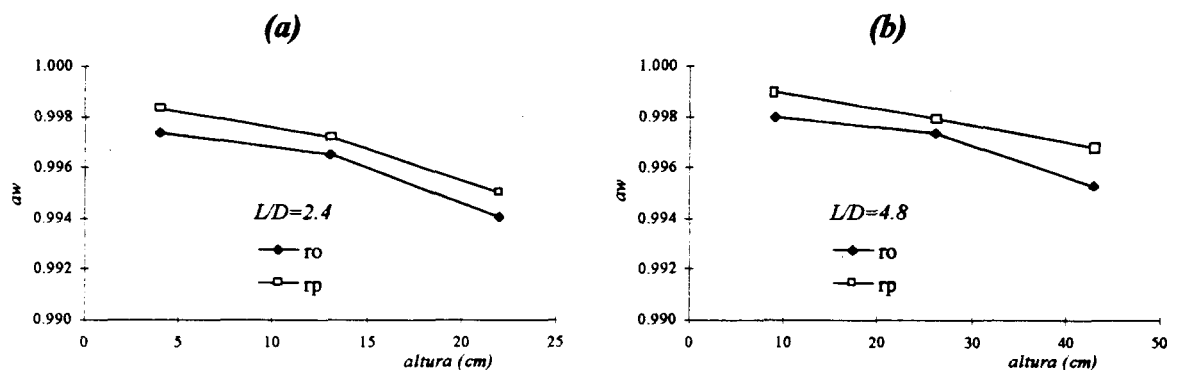
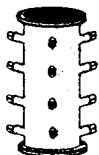


Fig 5.2.8. Perfiles axiales de actividad de agua en la producción de conidiosporas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=2.4$; (b) $L/D=4.8$

En lo que respecta al pH, los perfiles axiales se presentan en la Fig 5.2.9. El pH al inicio de la fermentación fue de 5. Como se observa en ambos reactores, en todos los puntos muestreados hubo un descenso significativo en el pH (mayor a la unidad). Cuando en el medio de cultivo se presentan sales de amonio a pH menores de 9 (como en este caso, en el cual se tuvo sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno), el amonio está presente como ión amonio (NH_4^+) el cual al ser incorporado en el microorganismo lo hace en forma de aminas (R-NH_3^+) , liberando por consiguiente iones hidronio, provocando con esto un descenso en el pH.



En las gráficas también se observa que en la periferia el pH fue incrementándose con la altura, mientras que en el centro de los reactores se mantuvo prácticamente constante.

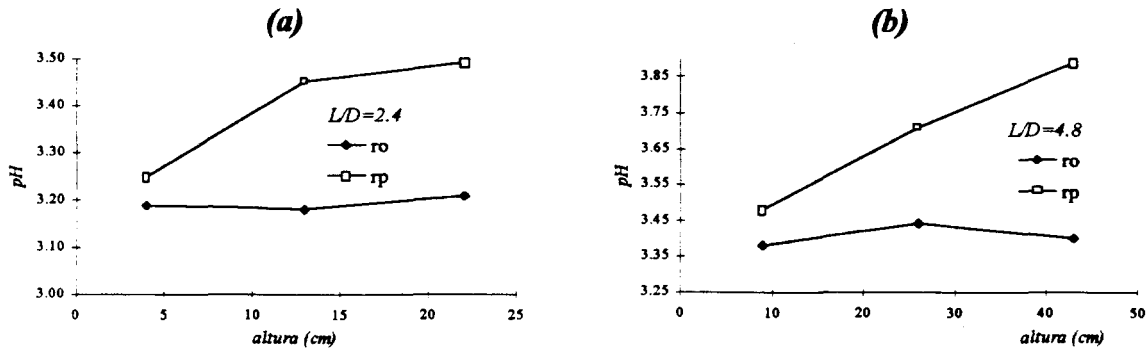


Fig 5.2.9. Perfiles axiales de pH en la producción de conidiosporas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) L/D=2.4; (b) L/D=4.8

Finalmente, en lo que se refiere a los perfiles correspondientes al número de esporas por gramo en peso seco de soporte (Esp/g.p.s), estos se presentan en la Fig 5.2.10. Lo más claro que puede observarse en estos gráficos, es que la esporulación fue mayor en la cercanía de las paredes de ambos reactores que en el centro. También debe hacerse notar que en las secciones inferiores de ambos reactores (4 y 9 cm), la esporulación en el centro y la periferia tuvo valores muy cercanos para cada uno.

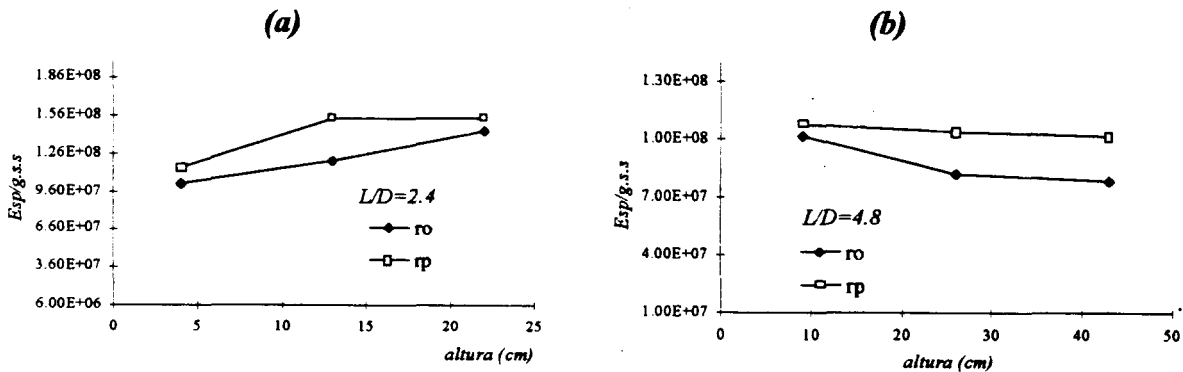
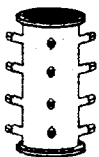


Fig 5.2.10. Perfiles axiales del número de esporas por gramo en peso seco de soporte (Esp/g.p.s) en la producción de conidiosporas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) L/D=2.4; (b) L/D=4.8



5.2.3. Perfiles axiales en la producción de mananasas

Para finalizar con esta sección del capítulo de resultados, enseguida se presentan los perfiles axiales correspondientes al proceso de producción de mananasas a partir de *Aspergillus oryzae*.

En la Fig 5.2.11, se muestran los perfiles axiales de humedad. Al inicio de la fermentación, la humedad fue del 60%. En las gráficas puede observarse lo siguiente: 1) En todos los casos se presentó una marcada diferencia entre la humedad central y la cercana a la pared, teniéndose un gradiente de humedad radial promedio de 10-15%, manteniéndose mejor la humedad en la periferia que en el centro; 2) La humedad fue disminuyendo tanto en el centro como en la periferia a medida que aumentó la altura de los reactores. Estos dos hechos, concuerdan con las cinéticas de temperatura observadas en cada uno de los reactores, en donde la sección central se mantuvo más caliente que la periferia a lo largo de la fermentación.

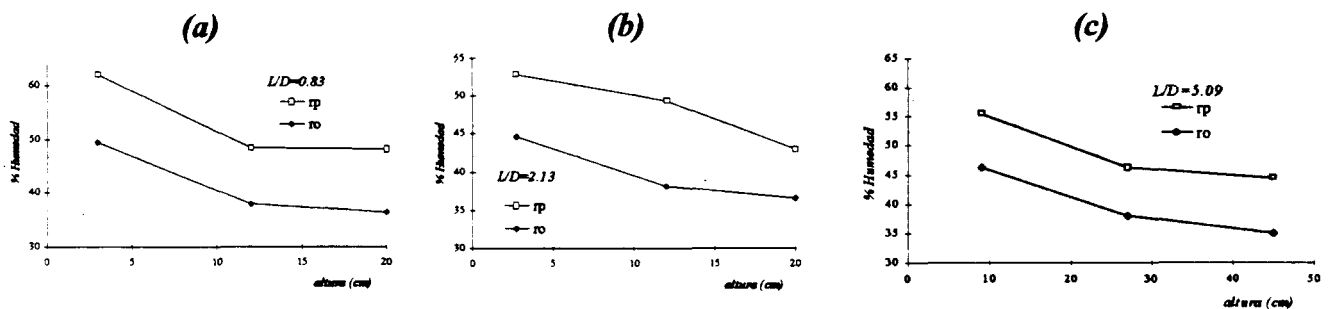
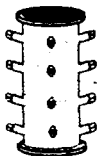


Fig 5.2.11. Perfiles axiales de humedad en la producción de mananasas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.83$; (b) $L/D=2.13$, (c) $L/D=5.09$

Los perfiles axiales correspondientes a la actividad de agua, se muestran en la Fig 5.2.12. Las gráficas de la figura muestran un comportamiento similar al de los perfiles de humedad, es decir existe una diferencia notoria entre los perfiles central y de la periferia



para cada reactor, sin embargo en cada perfil la disminución en la a_w no es tan marcada como en los perfiles de humedad.

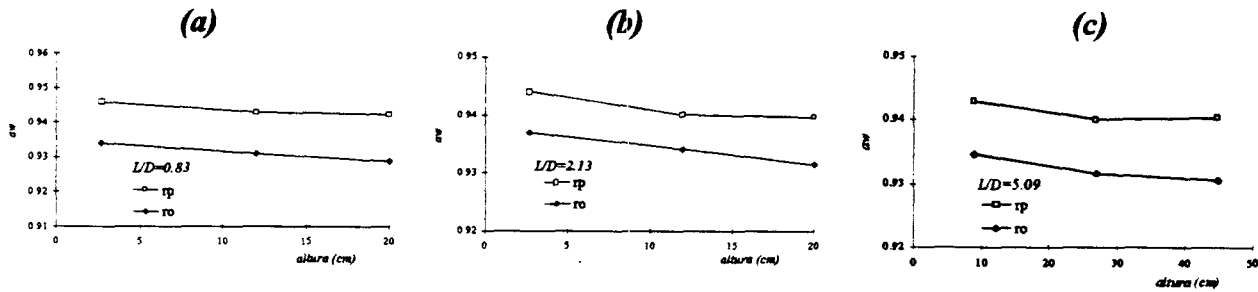


Fig 5.2.12. Perfiles axiales de actividad de agua en la producción de mananas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.83$; (b) $L/D=2.13$, (c) $L/D=5.09$

Los perfiles axiales de pH se muestran en la Fig 5.2.13. El pH con el cual se inició el proceso fue de 5.5. A excepción del punto correspondiente a las secciones inferiores y en la cercanía de la pared, se puede observar en los demás puntos muestreados, que el pH fue menor al inicial. Tomando en cuenta que el soporte-substrato, es rico en polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, la disminución de pH, probablemente se debió a la formación de ácidos orgánicos durante el consumo de los carbohidratos. En lo que respecta al comportamiento de los perfiles de pH en los reactores tenemos: 1) El perfil central, en todos los casos fue menor que el perfil axial en la cercanía de la pared; 2) Para ambos perfiles se presentó una disminución con respecto a la altura.

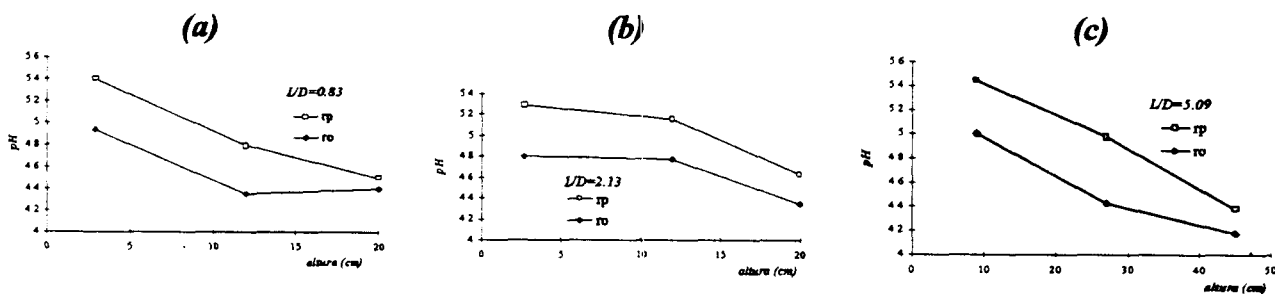
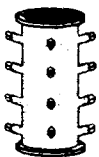


Fig 5.2.13. Perfiles axiales de pH en la producción de mananas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.83$; (b) $L/D=2.13$, (c) $L/D=5.09$



Finalmente en la **Fig 5.2.14**, se muestran los perfiles axiales de actividad como microgramos de manosa por gramo en peso seco de soporte por hora ($\mu\text{gManosa/g.p.s h}$). Se observa que el perfil de actividad en la periferia fue mayor al perfil central, y también que en ambos perfiles la actividad fue disminuyendo con respecto a la altura de los reactores. La disminución de la actividad con la altura, así como el gradiente radial de actividad, probablemente se haya debido al efecto de las altas temperaturas alcanzadas principalmente en las secciones central y superior de los reactores.

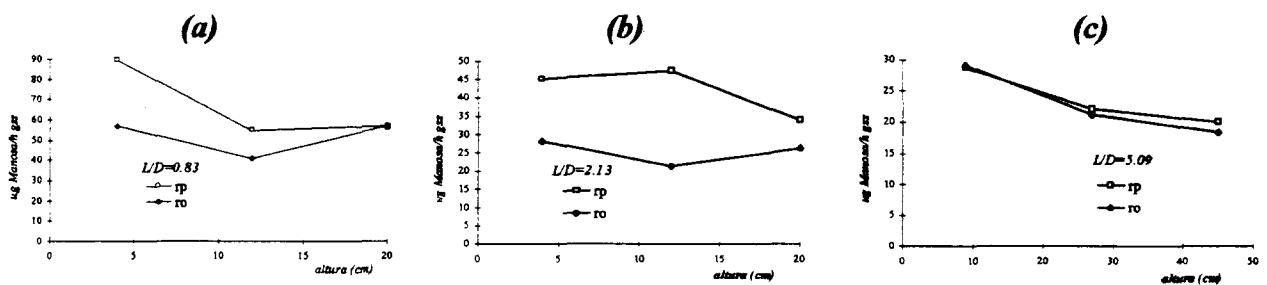
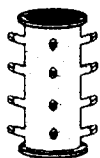


Fig 5.2.14. Perfiles axiales de actividad ($\mu\text{g manosa/g.p.s h}$) en la producción de mananasas para las diferentes configuraciones utilizadas. (a) $L/D=0.83$; (b) $L/D=2.13$, (c) $L/D=5.09$



5.3 Efecto del Reynolds en la producción de los metabolitos.

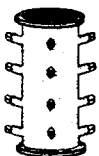
Para finalizar con este capítulo, se verá el efecto del número de Reynolds en la producción de los diferentes metabolitos.

Durante el proceso de producción del enzima *fenol-oxidasa*, se empleó una tasa específica de aireación de 1 VKGM (1 Laire/ Kgsop·min), manteniéndose constante durante todo el experimento y para todos los reactores. En la *Tabla 5.3.1*, se resumen los valores promedio en la producción de fenol-oxidasa para cada una de las geometrías probadas a sus correspondientes Reynolds.

Tabla 5.3.1 Producción promedio de fenol-oxidasa a las diferentes geometrías y Reynolds empleados.			
<i>L/D</i>	<i>Re</i>	<i>mU_{prom fenol-oxidasa}/gps</i>	<i>Desvest</i>
0.7	0.05	142.78	11.47
2.13	0.09	114.41	9.37
5.09	0.20	73.76	19.87

La producción promedio del enzima y su desviación estándar, se presentan como actividad promedio por gramo seco de soporte, estimándose estos valores a partir de los datos obtenidos de los seis puntos muestreados en cada reactor (*hirp, hiro, hmrp, hmro, hsrp, hsro*). Para observar de manera más clara el efecto del Reynolds, en la *Fig 5.3.1*, se gráfica la actividad promedio por gramo de soporte seco contra *Re*.

En esta gráfica, puede observarse que a medida que el Reynolds aumenta, la actividad promedio disminuye. También debe hacerse notar que existen diferencias entre las actividades promedio, ya que las desviaciones estándar para cada reactor no se superponen, tal como lo muestran las líneas punteadas en la *Fig. 5.3.1*.



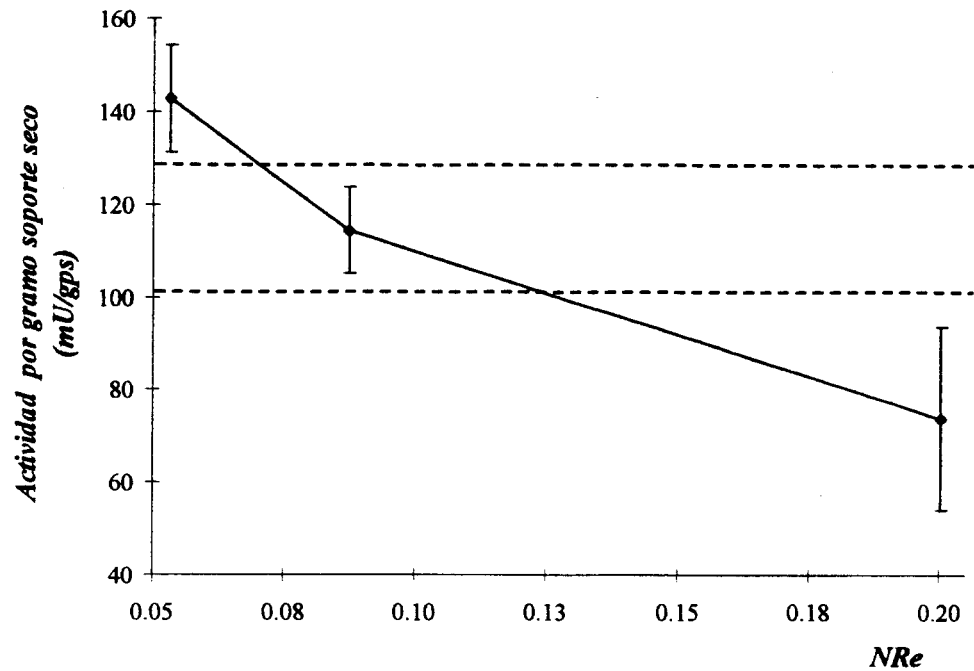
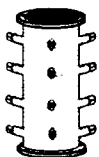


Fig. 5.3.1 Gráfica de actividad promedio de fenol-oxidasa por gramo seco de soporte contra número de Reynolds.

Para el proceso de producción del bioinsectisida, es decir de las *conidiosporas*, se utilizó una tasa específica de aireación de 0.75 VKGM (0.75 Laire/ Kgsop-min). De igual manera que en el experimento anterior la tasa de aireación se mantuvo constante durante todo el experimento y en todos los reactores. En la *Tabla 5.3.2*, se resumen los valores promedio en la producción de conidiosporas para cada una de las geometrías probadas a sus correspondientes Reynolds.

<i>Tabla 5.3.2 Producción promedio de conidiosporas a las diferentes geometrías y Reynolds empleados.</i>			
<i>L/D</i>	<i>Re</i>	<i>Esp_{promedio}/gps</i>	<i>Desvest</i>
1.2	0.09	2.10×10^8	2.28×10^7
2.4	0.17	1.54×10^8	2.23×10^7
4.8	0.35	1.03×10^8	1.37×10^7



La producción promedio de las conidiosporas y su desviación estándar, se presentan en forma de esporas por gramo de soporte seco. De manera similar que en el experimento anterior, estos valores fueron estimados a partir de los datos obtenidos de los seis puntos muestreados para cada reactor. En la *Fig 5.3.2*, se gráfica la producción promedio de conidiosporas por gramo de soporte seco contra *Re*.

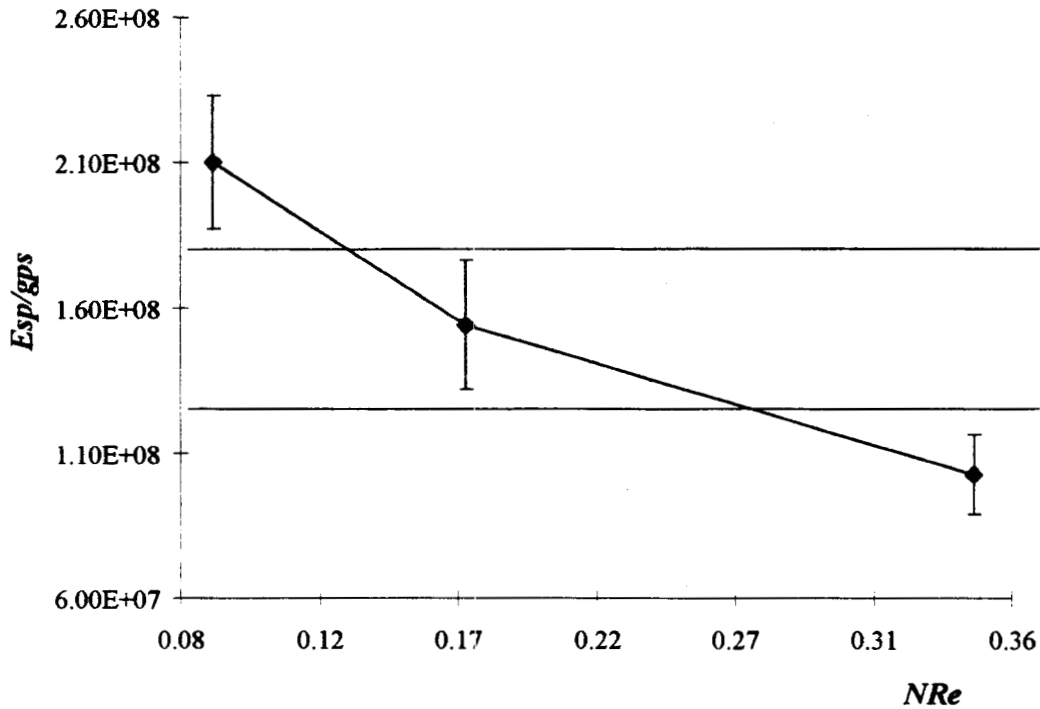
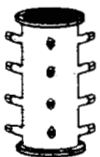


Fig. 5.3.2 Gráfica de la producción promedio de conidiosporas por gramo seco de soporte contra número de Reynolds.

En esta gráfica, también se puede observar que a medida que el Reynolds aumenta, la producción promedio de conidiosporas disminuye. Al igual que en la gráfica anterior,

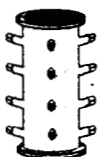


se presentan diferencias entre las producciones promedio, puesto que las desviaciones estándar no se superponen como lo muestran las líneas punteadas (*Fig. 5.3.2*).

Finalmente para el proceso de producción de *mananasas*, se utilizó una tasa específica de aireación de 3 VKGM (3 Laire/Kgsop-min), manteniéndose constante durante el experimento y en todos los reactores. En la *Tabla 5.3.3* se resumen los valores promedio en la producción de mananasas para cada una de las geometrías probadas a sus correspondientes Reynolds.

Tabla 5.3.2 Producción promedio de mananasas a las diferentes geometrías y Reynolds empleados.			
<i>L/D</i>	<i>Re</i>	$\mu\text{g manosa}_{\text{promedio}}/\text{gps h}$	<i>Desvest</i>
0.83	0.137	59.46	16.04
2.13	0.174	33.69	10.5
5.09	0.417	23.20	4.53

La producción promedio de mananasas y su desviación estándar, se presentan en forma de actividad por gramo de soporte seco. De manera similar que en los experimentos anteriores, estos valores se estimaron a partir de los datos obtenidos de los puntos muestreados para cada reactor. En la *Fig 5.3.3*, se gráfica la actividad promedio por gramo de soporte seco contra *Re*. En esta gráfica también puede observarse la misma tendencia que en los casos anteriores, el Reynolds aumenta y la actividad promedio disminuye, sin embargo en este caso no se presentaron diferencias entre las actividades promedio, puesto que las desviaciones estándar se superponen, tal como se ve en la (*Fig. 5.3.3*).



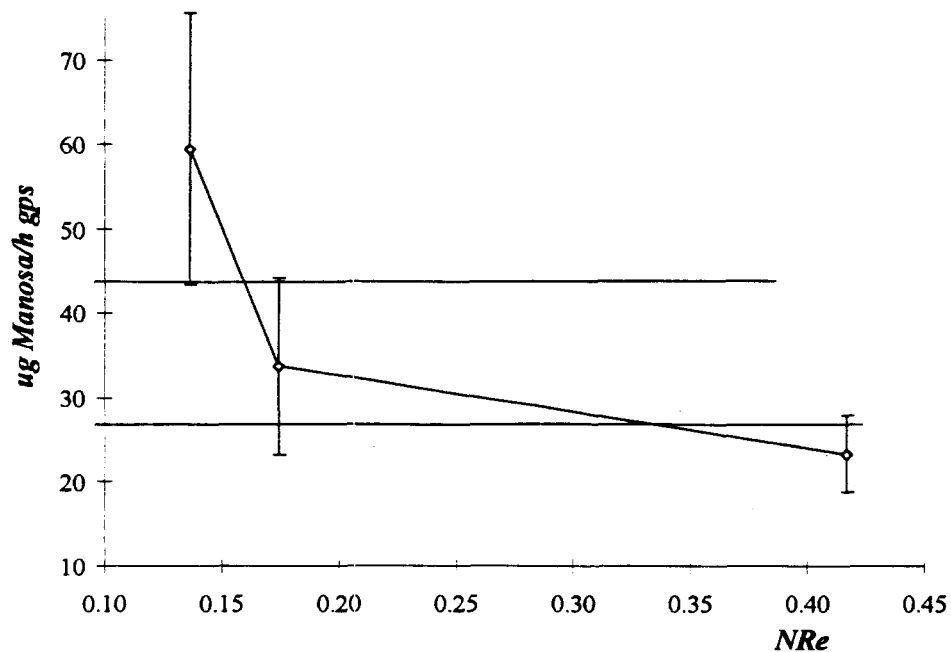
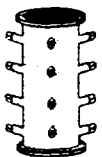


Fig. 5.3.3 Gráfica de la actividad promedio de mananasas por gramo seco de soporte contra número de Reynolds.

En todos los casos, el número de Reynolds se calculó basándose en la ecuación 4.6.12, en donde a excepción de la velocidad superficial todos los demás parámetros se consideraron constantes. Así al depender el número de Reynolds de la velocidad superficial (V_o), ve involucrado el diámetro de la base del reactor (que es el mismo a la del área transversal al flujo D). Basándose en lo anterior, el ir aumentando el Reynolds implica una disminución en el área transversal al flujo (A_t) con respecto a la longitud de empaque (L_t), con lo cual se tiene un aumento de la relación L/D , como se observa en las **Tablas 5.3.1, 5.3.2 y 5.3.3.**

Fijémonos en el cociente formado entre al área transversal al flujo (A_t) y la longitud de empaque (L_t), es decir la relación A_t/L_t . El aumento en este cociente puede relacionarse con una mejor distribución del aire alimentado a los reactores tubulares



(Fig. 5.3.4), la cual es fundamental para aumentar la transferencia de gases, remoción del calor metabólico, y humidificación del soporte (Mudgett, 1986).

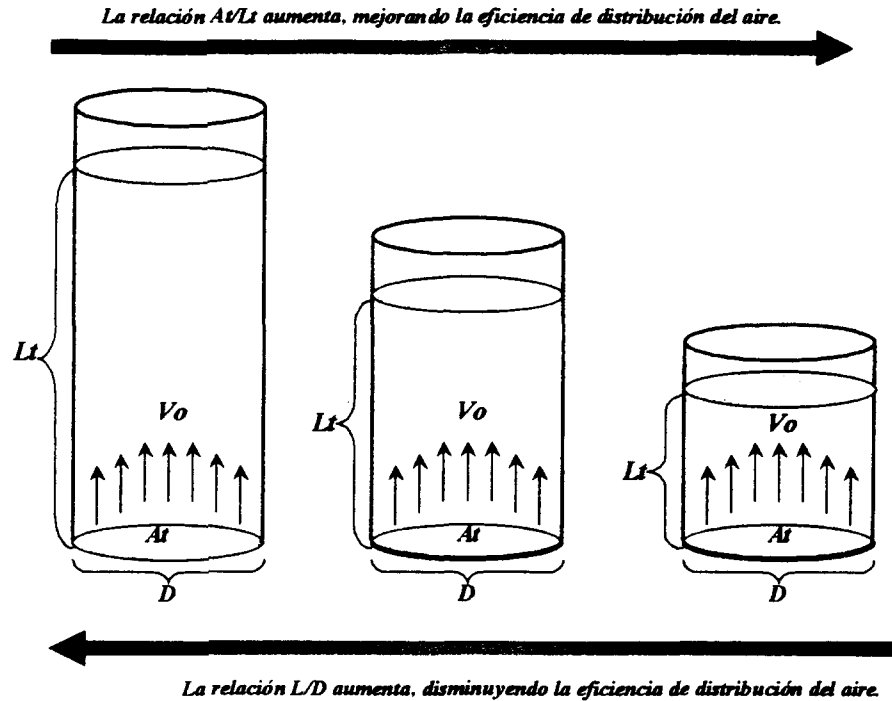
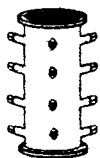


Fig. 5.3.4. Efecto de la geometría en la distribución del aire en los reactores tubulares.

Debe quedar claro que las relaciones L/D y At/Lt son inversas. De esta manera al ir aumentando la relación L/D (que va a la par con el número de Reynolds), la distribución del aire alimentado a los reactores empeora, teniendo como consecuencia un bajo intercambio gaseoso, menor remoción del calor y una ineficiente humidificación del material de soporte, con lo cual se ve afectado el metabolismo de los microorganismos y por lo tanto la producción de los metabolitos. Es debido a esto que al ir aumentando el Reynolds, se refleja con un efecto negativo en la producción de los diferentes metabolitos.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

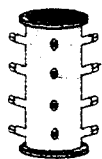
● Las cinéticas de temperatura durante la producción por FMS de los metabolitos fenol-oxidasa y conidiosporas en el sistema modular de reactores, mostraron que ambos procesos se llevaron de manera casi isotérmica a 29°C. Para estos casos la aireación forzada demostró ser eficiente en la remoción del calor metabólico, permitiendo mantener el control de temperatura.

● Las cinéticas de temperatura durante la producción por FMS de las mananasaas, mostraron una gran acumulación de calor en el sistema modular de reactores, siendo el punto más caliente el centro de los mismos (*hmro*). Los máximos de temperatura en los reactores con las geometrías (*L/D*) 0.83, 2.13 y 5.09 fueron 52, 63 y 53°C respectivamente.

● El equipo y la metodología empleados en las cinéticas de gases (CO₂ generado y O₂ consumido) durante la producción de los diferentes metabolitos, permitieron seguir el desarrollo de la actividad microbiana de los microorganismos *Streptomyces cyaneus*, *Beauveria bassiana* y *Aspergillus oryzae*.

● En la producción de cada uno de los metabolitos, los perfiles axiales de pH y actividad enzimática mostraron ser únicos para cada una de las geometrías. Los perfiles axiales correspondientes a la humedad y actividad de agua (*aw*), mostraron un descenso en sus valores al incrementarse la altura de los reactores, ocurriendo esto en los tres procesos y para todas las geometrías probadas.

● El incremento en el número de Reynold mostró tener un efecto negativo en la producción de los tres metabolitos. Esto se debió probablemente a la disminución de la relación *At/Lt* (*At*, área de transferencia perpendicular al flujo y *Lt*, Longitud de empaque), lo cual influyó en la distribución del aire en el interior de los reactores.



REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

Agosin, E; Odier E. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985 vol 21 pp 397-403.

Auria Richard, Jorge Palacios, and Sergio Revah. 1992. Determination of the Interparticular Effective Diffusion Coefficient for CO₂ and O₂ in Solid-State Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol 39, pp 898-902.

Auria Richard, Marcia Morales, Elba Villegas, and Sergio Revah. 1993. Influence of Mold Growth on the Pressure Drop in Aerated Solid State Fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol 41, pp 1007-1013.

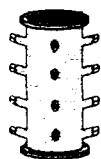
Beaudin, R.F; Caron, R.Legros,J; Ramsay,L.Lawlor and B.Ramsay. Cocomposting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost Science & Utilization*. 1996. Vol 4 pp 37-45.

Berrocal M; Huerta, S; Rodríguez, J; Pérez L.M; Arias, M.E.. Effect of water activity on cell growth and phenol-oxidase production by *Streptomyces cyaneus* var. *Viridochromogenes* in surface culture. *World Journal of Mycology & Biotechnology*, 1996, vol 12 pp 417-418.

Bradford M M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. Vol 72 pp 248-254.

Civas, A; Eberhard, R.; Le Dizet, P; Petek, F. *Biochem. J*. 1984. 219, 857-863.

Conrad, D. A high xylanase and xylosidase producing strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnol letters*. 1981: Vol 3 No 7 pp 345-350.



Referencias

Cooney, C.L. Growth of microorganism in State Solid Culture (SSC). *Biotechnology*. 1981 vol 1 pp 73-112.

Crawford, D.L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Applied and Enviromental Microbiology*. 1978 vol 35 pp 1041-1045.

Chahal, D.S. Foundation of Biochemical Engineering Kinetics and Thermodynamics in Biological Systems. American Chemical Society, Whashington D.C., 1983, pp. 421-442.

Deschamps,F; Huet M.C. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1985. Vol 22 pp 177-180.

Desgranges, C; Vergoignan, C.; Lereec, A.; Riba, G.; Durand. Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. Solid-Substrate-Fermentations. Chisti,Y.; Silman, R.W.; Matsuno, R.;Tanner, R.D.; Wang, H.H. eds. 1993 vol 11, no 3 pp, 577-587.

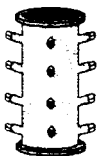
Edwards, R.L. Composting (Hayes, W.A., Ed.) The Mushroom Grower's Association, London, 1977, pp 32-36.

Goettel, H.S. Fungal agents for biocontrol; Biological control of locus and grasshoppers. Lomer, C.J.; Prior, C. Eds. Wallingford UK Tucson, Az USA. 1992 pp 122-132.

Grajek, W. & Gervais, P. Effect of the sugar beet pulp water activity on the solid state culture of *Trichoderma viride* TS. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1987 vol 26 pp 537-541.

Gutiérrez, R. M; S. Amar Aboul H; Auria R; Revah S; Torres, F.E. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 1996 vol 31 No. 4 pp 363-369.

Hatakka, A.I. J. *Appl. Microbiol Biotechnology*. 1983, vol 18, pp 350-357.



Hayes, W.A; In Composting, The Mush room Grower's Association, London. 1977, pp 1-20.

Hegedus, D.D; Bidochka M.J; Miranpuri G.S y Khachatourians. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 1990, vol 33 pp 641-647.

Hesseline C.W. 1972. Solid State Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* Vol XIV, pp 517-532.

Kamra, D.N. an Zadrazil, F. *Biotechnology Letters.* 1984, vol 6 pp 335-340.

Knapp, J.S. and Howell, J.A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Wiseman, A., ed. 1980 pp 85-143.

Levenspiel, O. Flujo de fluidos & Intercambio de Calor. De Reverte. 1993 pág 119-123.

Levonen-Munoz, E. and Bone, D.H. *Biotechnol Bioeng.* 1985, vol 27 pp 382-387.

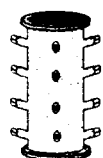
Lindenfeiser, L.A. & Ciegler, A. *Appl. Microbiol.* 1975, 29, 323-327.

Lonsane B.K, Ghildyal N.P, Budiaman S, Ramakrishna S.V; Engineering aspects of solid state fermentation; *Enzyme Microb, Technology*; 1985, vol 7 pp 258-264.

Mandels, M; Weber J. The production of cellulases. *Adv Chem Series.* 1975. Vol 95 pp 391-414.

Masood A; Attridge M.C.; Myers G.C.; Blanchette R.A. Biomechanical Pulping of Loblolly Pine Chips with Selected White-Rot Fungi. *Holzfoschung*, 1993. vol 47, pp 36-40-

Miranpuri, G.S.; Khachatourians, G.G. Hemocyte surface changes in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* in response to wounding and infection with *Beauveria bassiana*. *Entomol Exp Appl*, 1993 vol 68, 2, pp 157-164.



Referencias

Mudgett Richard E. 1986. Solid-State Fermentations. Manual of Industrial Microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 66-81.

Nishio, N.; Tai, K. and Nagal, S. J. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 1979, 8, 263-270.

Oriol,E.; Raimbault, M; Roussos, S. & Viniestra Gonzales. G. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988 vol 27 pp 498-503.

Peczynska-Czoch, W.; Urbanczyk, M.J. Production of beauvericin by *Beauveria bassiana* on L-methionine enriched medium. *Inmunol Arch Ther Exp.* 1991, vol 39 1-2, pp. 181-184.

Pereira, R.M.; Stimac, J.L; Alves, S.B. Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, 1993 vol. 61, 2 pp 156-161.

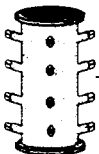
Raimbault, M; Alazard, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *J. Appl Microbiol Biotech.* 1980. Vol 9 pp 199-209.

Rao, M; Mithal, B; Thakkur, R; Sastry, K. Solid-state fermentation for cellulase production by *Pestalotiopsis versicolor*. *Biotechnol Bioeng.* 1983. Vol 25 pp 869-873.

Rättö, M; Poutanen, K. Production of Mannan-degrading enzymes. *Biotechnology Letters.* 1988. Vol 10 No 9 pp 661-664.

Reid, D Ian. Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme Microb. Technol.* 1989 vol 11 pp 786-803

Saucedo Castañeda, M.R. Trejo Hernández. 1994. On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO₂ and O₂ in Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. *Process Biochemistry.* Vol 29, pp 13-24.



Silman, R.W.; Conway, H.F.; Anderson, R.A. and Bagley, F.B. *Biotechnol Bioeng.* 1979, 21, 1799-1808.

Tauro, P., Chaudary, K. And Ethiraj, S. Fifth International Fermentation Symposium. Dellweg, H., ed. Berlin, 1976 p. 40.

Thomas, K; Khachatourians G and Ingledew W.M. Production and propeties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *J. Microbiol*, vol 33 pp 12-20.

Toyama N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnol letters*. 1983. Vol 5 No 8 pp 207-209.

Yang, S.S; Chiu, L; Yaun S.S; Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus*: gas and temperature patterns in a solid-state column reactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1994 vol 10 pp 215-220.

