

REPORTE

CONACYT •

Octubre 1989 - Agosto 1990

NOMBRE DEL PROYECTO

**ESCALAMIENTO DE FERMENTADORES EN ESTADO
SOLIDO**

Responsables del Proyecto:

Dr. Sergio REVAH (CBI-UAM Iztapalapa)

Dr. Richard AURIA (ORSTOM - Francia)**

*** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia**

*** * Instituto Frances de Investigacion
Cientifico para el Desarrollo en Cooperacion**

DIRECCION ADJUNTA DE DESARROLLO TECNOLOGICO

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

INFORME TECNICO ANUAL
(Septiembre-julio 1990)

Fecha de presentación:

NOMBRE DEL PROYECTO

ESCALAMIENTO DE FERMENTADORES EN ESTADO SOLIDO

CLAVE DEL PROYECTO

CONVENIO P122CCOT89 / 4391

COORDINADOR DEL PROYECTO:

Dr. Sergio REYAH

INSTITUCION:

**División C.B.I.
Departamento de Ing. de Procesos e Hidráulica
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Av. Michoacán y Purísima, Col. Vicentina, Iztapalapa
CP 09340
México D.F.**

Compilado y editado por Richard AURIA y Sergio REYAH con la participación de Sergio HERNANDEZ, Jorge PALACIOS, Juan CAMPOS, Julian ANGELES, Elba VILLAREAL, Ruel LOPEZ y Mariano GUTIERREZ.

1. OBJETIVOS DEL PROYECTO Y METAS CUMPLIDAS

*** OBJETIVOS DEL PROYECTO**

El objetivo global de este proyecto es de mejorar nuestros conocimientos de los fenómenos de transporte de masa y calor aplicados a los fermentadores en estado sólido (FES) con el objeto de elucidar los pasos controlantes y de sentar las bases de un escalamiento de reactores en FES. Los objetivos particulares de este trabajo fueron los siguientes.

En primer lugar fue de encontrar un soporte modelo lo cual tendría propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser usado en FES. Este soporte deberá ser inerte biológicamente, sin inhibidores al crecimiento del microorganismo, de forma bien definida y mantener un alto contenido de agua sin drenaje macroscópico (espacio interpartícula). Además, esta agua deberá ser disponible para el microorganismo y deberemos conocer un máximo de parámetros fisicoquímicos, de preferencia, ya disponible en la literatura.

Después de haber escogido el soporte adecuado, usando un medio de cultivo y un microorganismo seleccionado, tendremos que caracterizarlo mediante diferentes parámetros termodinámico y biológico. Este estudio permitirá de establecer que el crecimiento del hongo sobre este dicho soporte es comparable a lo que se encuentra con los soportes agrícolas usados frecuentemente en la FES. Al mismo tiempo tendremos que desarrollar una metodología para las diferentes medidas de los parámetros biológicos. Principalmente nos enfocaremos sobre las medidas de concentraciones de biomasa y de azúcares.

La segunda parte de este trabajo será usar este soporte para estudiar los fenómenos de transporte de masa y calor acoplados con la biología del medio.

En un primer paso tendremos que diseñar un reactor sencillo en donde los fenómenos de transporte de masa (gas) y calor sean bien identificados. Es decir, buscaremos el modelo físico "ideal" para tener un reactor de tipo isotérmico, sin flujo convectivo, en donde la difusión de oxígeno y dióxido de carbono sean el principal fenómeno de transporte de masa. Con este sistema de reactor estudiaremos el comportamiento del microorganismo en un ambiente de O_2 y CO_2 diferente a las condiciones normales (aire ambiental, $O_2 = 21\%$ y $CO_2 = 0\%$) empleada de costumbre en FES.

La tercera parte será diseñar un reactor modular de tipo convectivo en donde el transporte de masa es unidireccional. Con este prototipo, se medirá en la dirección axial las concentraciones de CO_2 y O_2 , la temperatura y la presión total de la fase gaseosa.

Además, mediremos en la entrada el flujo de aire, la humedad relativa del aire (entrada y salida). Esta primera parte del estudio será principalmente enfocada sobre el diseño del reactor y su instrumentación. Para seguir el crecimiento del hongo durante el proceso sin destruir el lecho poroso, trataremos de desarrollar un método para medir indirectamente la biomasa mediante la caída de presión. Este experimento será en un primer paso realizado a nivel de columnas pequeñas para después comprobar el método a una escala mayor.

El último paso será desde de ahora buscar un máximo de información (bibliografía) para pensar en el diseño de reactores de mayor capacidades para la FES.

*** METAS CUMPLIDAS**

TECNICAS ANALITICAS

PREVISTO: 100 %

LOGRADO: 100 %

BIOMASA Y SUBSTRATO ASIMILABLE

PREVISTO: 100 %

LOGRADO: 100%

SENSORES:

PREVISTO: 100 %

LOGRADO: 100 %

SUBSTRATO O SOPORTE:

PREVISTO: 100 %

LOGRADO : 100 %

FERMENTACIONES ESTATICAS

ESTUDIOS CON REACTORES SIN GRADIENTES:

PREVISTO: 100 %

LOGRADO : 100 %

FLUJO DIFUSIVO DE O₂, CO₂ Y HUMEDAD

PREVISTO: 100 %

LOGRADO : 100 %

**FLUJO CONYECTIVO DE AIRE EN
FERMENTADORES ISOTERMICOS**

CON GRADIENTES AXIALES

PREVISTO: 50%

LOGRADO: 50 %

MODELAMIENTO:

PREVISTO: 90%

LOGRADO: 60 %

FERMENTACIONES DINAMICAS

DISEÑO DE FERMENTADOR AGITADO DE TAMBOR

PREVISTO: 90%

LOGRADO: 60 %

EVALUACION DE CINETICAS DE CRECIMIENTO

PREVISTO: 90%

LOGRADO: 60 %

CARACTERIZACION DE ESFUERZOS DE CORTE

PREVISTO: 90%

LOGRADO: 60 %

OBTENCION DE PARAMETROS DE ESCALAMIENTO

PREVISTO: 90%

LOGRADO: 60 %

2. **DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**
3. **RESULTADOS OBTENIDOS**

Como mencionado anteriormente el objetivo general de este trabajo fue enfocado sobre el estudio del escalamiento de fermentadores en estado sólido. Los diferentes estudios realizados se presentan en forma de cuatro anexos, en cada uno, hemos desarrollado un trabajo específico. En lo que sigue, damos un resumen de cada anexo.

ANEXO I: Caracterización y evaluación físico-biológica de soportes inertes para la fermentación sólida.

Sabiendo lo difícil que es de trabajar con soportes agrícolas para mejorar nuestros conocimientos básicos hemos desde el inicio buscado un soporte el cual presentaría varias ventajas para la FES. En un primer paso hemos comparado diferentes soportes tal como: esponjas, espumas de poliuretano, vermiculita, fibras sintéticas y resinas. Para seleccionar el soporte más adecuado hemos escogido tres criterios:

- que el soporte no tenga ningún inhibidor para el crecimiento del hongo,
- que el soporte tenga una alta capacidad de retención de agua sin presencia de fenómeno de drenaje macroscópico,
- que existe ya en la bibliografía, para este dicho soporte, un máximo de conocimientos en los parámetros físico-químicos.

De los estudios que se hicieron, el soporte que cumplió lo más los requisitos fue una resina intercambiadora iónica: la amberlite IRA-900.

Este soporte presenta muchas ventajas para la FES:

- es inerte biológicamente y no tiene ningún inhibidor al crecimiento de Asp. niger,
- su estructura sólida no cambia durante el proceso,
- es esférico y no se deforma durante toda la fase de crecimiento del hongo,
- los porcentajes iniciales de las diferentes fases (sólida, líquida, gaseosa) en el reactor son siempre las mismas (el empaque es constante),
- se conoce muchos parámetros físico-químicos (densidad, porosidad, carga iónica,...),
- el crecimiento del hongo se desarrolla solo en la superficie lo cual facilita las observaciones al microscopio,
- se puede recuperar fácilmente toda la biomasa con solamente una agitación mecánica. Se facilita las medidas de biomasa por este método.

En un segundo paso hemos caracterizado el crecimiento de Asp. niger sobre este soporte siguiendo durante la fermentación diferentes parámetros como: biomasa, azúcares residuales, pH, humedad, actividad de agua, CO_2 , O_2 , caída de carga, distribución de tamaño de partículas. Una comparación de los resultados obtenidos con resultados obtenidos con soportes agrícolas nos permitió concluir que esta resina es representativa de la mayoría de los soportes que se usan ya en FES y que se podría usar como soporte modelo. En conclusión, hemos demostrado en esta parte del estudio que este soporte se puede usar como soporte modelo tanto para mejorar nuestros conocimientos del crecimiento de un hongo como para estudios de ingeniería. Se sometió a revisión un trabajo a Biotechnology Letters con algunos resultados de esta parte del proyecto. ANEXO V

ANEXO II. Estudio en reactor difusivo isotérmico de los parámetros de cinética de crecimiento de Aspergillus niger.

Una vez seleccionado el soporte modelo, se empezó con los primeros estudios en reactores. En primer lugar, para facilitar el entendimiento de los fenómenos termobioló-

gicos en un reactor de tipo industrial, hemos trabajado con un reactor sencillo isotérmico y en dónde el principal fenómeno de transporte sea la difusión de O_2 y CO_2 . El medio de cultivo usado para estos experimentos fue de tipo CZAPECK modificado y el microorganismo fue Asp. niger. Durante el proceso se midió en la dirección axial del reactor los perfiles de CO_2 , O_2 , Temperatura, Biomasa, pH, humedad. De los balances de CO_2 y O_2 se calculó las tasas de producción de O_2 y de consumo de CO_2 en cada niveles del reactor y contra el tiempo. Después hemos calculado el coeficiente de actividad respiratoria de O_2 , valor comparable a lo que se encuentra en la bibliografía. Este tipo de experimento mostró que en condiciones no estandar de O_2 (21 %) y CO_2 (0%) el crecimiento del microorganismo puede iniciar más temprano, posiblemente por el efecto promotor del CO_2 sobre la germinación.

ANEXO III. Estudio en reactor convectivo (1D²) de los parámetros termodinámico y biológico del crecimiento de Asp. niger.

Después de este primero trabajo, hemos diseñado y construido un reactor modular de 90 cm de alto con lo cual se puede estudiar el fenómeno convectivo. Este reactor fue instrumentado para medir en los diferentes niveles (dirección axial):

- Las concentraciones de CO_2 y O_2 ,
- La temperatura,
- La caída de carga.

y en la entrada y la salida del reactor:

- el flujo de aire,
- la humedad relativa del aire.

Los primeros resultados obtenidos mostraron que existía correlaciones entre la temperatura y la producción de CO_2 y también la caída de carga y el CO_2 , O_2 .

Hemos observado que durante el crecimiento del hongo la caída de carga estaba relacionada con la evolución de la biomasa. Por el hecho que el crecimiento se hace solamente en superficie, el hongo durante su desarrollo coloniza el espacio vacío interpartícula tapando los poros. Por eso, hemos desarrollado experimentos con columnas pequeñas midiendo contra el tiempo la caída de carga y la biomasa. Hemos mostrado mediante estos experimentos que la caída de carga seguía perfectamente la evolución de la biomasa. Hemos calculado el coeficiente de permeabilidad gaseosa lo cual es una función de la biomasa. De eso, trataremos, mediante esta relación entre la caída de carga y la biomasa seguir y medir el crecimiento del hongo en un reactor de más grande capacidad.

ANEXO IV. Proyecto de biorreactores para fermentación en sustrato sólido.

En esta parte, se revisaron las publicaciones más recientes sobre biorreactores para la FES. Se planteo los objetivos y la definición del trabajo para llegar hasta un diseño de prototipo de biorreactores comparando las diferentes posibilidades.

4. DIFICULTADES ENCONTRADAS

No se encontraron dificultades extraordinarias en la realización del proyecto, sin embargo persisten las dificultades típicas de hacer investigación en México sobre todo lo relacionado con lo encarecidos que están los equipos y materiales de importación y lo poco cumplido de los proveedores.

5. ETAPA DEL PROCESO TECNOLÓGICO

6. TRANSFERENCIA DEL PROYECTO

El proceso se encuentra a nivel de asimilación de tecnología en lo que respecta a la comprensión de los fenómenos relevantes para el escalamiento de FES. Se ha avanzado grandemente en la comprensión de los parámetros de transferencia más relevantes en este tipo de proceso. Lo anterior ha sido posible gracias al uso de soportes 'modelo' que facilitan grandemente el análisis del reactor.

Estamos iniciando la transferencia de los conocimientos a la producción de un metabolito secundario de interés comercial en conjunto con el Depto. de Biotecnología de la UAM. El proyecto aportará los conocimientos de dos grupos de investigación: nosotros en la parte de diseño de reactor y la contraparte de Biotecnología en los aspectos básicos de microbiología y Bioquímica.

Por otra parte no se han identificado empresas interesadas en asimilar los conocimientos desarrollados con los estudios presentados en este reporte. Sentimos que esto vendrá como consecuencia de la divulgación de resultados.

BIBLIOGRAFIA

- * BAJARCHAYA A. AND MUDGETT E. (1980) BIOTECHNOL. BIOENG., 22, 2219
- * RATHBUN B. AND SHULER (1983) BIOTECHNOL. BIOENG., 25, 929
- * NARAHARA H., KOYAMA Y., TOSHIMI Y., ALTHASAMPUMA A. AND TAGUCHI H (1984) J. FERMENT. TECHNOL. 62, 5, 453
- * SATO K., NAGATANI M., NAKAMURA K., SATO S. (1983) J. FERMENT. TECHNOL. 61, 5, 623
- * ERGUN S. (1952) CHEM. ENG. PROGR., 48, 89

ANEXO I

**EVALUACION Y CARACTERIZACION FISICO-BIOLÓGICA
DE SOPORTES
INERTES PARA LA FERMENTACION
SOLIDA**

"EVALUACION Y CARACTERIZACION FISICO-BIOLOGICA DE
SOPORTES INERTES PARA FERMENTACION SOLIDA".

INDICE

PARTE 0

PAGINA.

RESUMEN.....8

PARTE I

INTRODUCCION.....10

ANTECEDENTES.....12

OBJETIVOS.....14

PARTE II

CARACTERIZACION FISICA Y BIOLOGICA DE LOS SOPORTES.

A. DESCRIPCION DE LOS DIFERENTES SOPORTES.....16

S 1 PRESENTACION DE LOS SOPORTES.....16

S 2 PARAMETROS FISICOQUIMICOS DE LOS SOPORTES.....20

B. ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LOS SOPORTES.....21

S 3 JUSTIFICACION.....21

S 4 PRINCIPIO DEL EXPERIMENTO.....21

S 5	DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION.....	21
1.-	DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	21
2.-	MEDIDA DEL DIAMETRO DE CRECIMIENTO.....	23
3.-	MODO DE OPERACION.....	23
S 6	ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	24
C.	ESTUDIO DEL DRENAJE DE LOS SOPORTES.....	29
S 7	JUSTIFICACION.....	29
S 8	PRINCIPIO DEL EXPERIMENTO.....	29
S 9	DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION.....	29
1.-	DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	29
2.-	MEDIDA DE LA HUMEDAD.....	31
3.-	MODO DE OPERACION.....	31
S 10	ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	32
1.-	CASO DEL POLIURETANO 1 (PO-1).....	32
2.-	CASO DEL POLIURETANO 2 (PO-2).....	37
3.-	CASO DE LA FIBRA 1 (FI-1).....	40
4.-	CASO DE LA ESPONJA 1 (ES-1).....	44
5.-	CASO DE LA RESINA (AMBERLITA IRA-900).....	48
6.-	SINTESIS DE LOS EXPERIMENTOS DE DRENAJE.....	49
D.	CONCLUSION PARTE II.....	51

PARTE III

CARACTERIZACION DEL CRECIMIENTO DE ASPERGILLUS NIGER SOBRE
AMBERLITA IRA-900.

A. DESCRIPCION DE LA AMBERLITA.....	54
B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA DE LA AMBERLITA.....	55
S 11 JUSTIFICACION.....	55
S 12 DEFINICION DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA.....	56
S 13 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION..	56
1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	56
2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA.....	57
3.- MODO DE OPERACION.....	57
S 14 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES...	58
1.- COMPARACION DE LAS ISOTERMAS DE ABSORCION Y DESORCION.	
2.- COMPARACION DE LA A_w ENTRE LA AMBERLITA, YUCA Y BAGAZO.	
C. ESTUDIO DE LA DESHIDRATACION DE LA AMBERLITA..	60
S 15 JUSTIFICACION.....	60
S 16 PRINCIPIO DEL EXPERIMENTO.....	60
S 17 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION..	60
1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	60
2.- MODO DE OPERACION.....	61
S 18 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES...	61

D. SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO.....	62
S 19 JUSTIFICACION.....	62
S 20 FUNDAMENTO DEL EXPERIMENTO.....	62
S 21 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION...	62
1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	62
2.- CUANTIFICACION DE: PROTEINAS, AZUCARES Y PH...	64
* PROTEINAS.....	64
* AZUCARES	65
* PH.....	66
3.- MODO DE OPERACION.....	66
* COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	66
* CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	67
* METODOLOGIA.....	67
S 22 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES....	68
D. CARACTERIZACION DEL CRECIMIENTO DE ASPERGILLUS NIGER SOBRE AMBERLITA.....	69
S 23 JUSTIFICACION.....	69
S 24 FUNDAMENTO DEL EXPERIMENTO.....	70
S 25 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION...	70
1.- DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.....	70
2.- MODO DE OPERACION.....	70
* TRATAMIENTO DEL SOPORTE.....	70
* PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO E INOCULO.	71
* CONDICIONES DE OPERACION.....	71
* DESARROLLO DEL EXPERIMENTO.....	71
* METODOLOGIAS EMPLEADAS.....	72

S 26	ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	74
F.	CONCLUSION PARTE <u>III</u>	82
S 27	CONCLUSION GENERAL.....	83
S 29	BIBLIOGRAFIA.....	85

PARTE 0

RESUMEN:

El objetivo principal de este trabajo fue encontrar un soporte, que se pudiera usar como soporte modelo, para estudios básicos de Fermentación en Estado Sólido. Basandonos en las propiedades físicas y biológicas de algunos soportes tales como: espuma de poliuretano, esponja de celulosa, fibras y resinas, se selecciono un soporte que en función de nuestros objetivos fue el más idoneo.

Para escoger el soporte más adecuado, seleccionamos algunos criterios fisicoquímicos que debería de cumplir este soporte, estos criterios son:

- No deberá de presentar inhibidores para el crecimiento de Asp. niger cepa No 10.
- No deberá de ser degradada la matriz sólida durante el crecimiento.
- Deberá de poseer una alta retención de agua sin drenaje macroscópico.
- Poseer información sobre parámetros fisicoquímicos.

Seleccionado el soporte, que fue la AMBERLITA IRA-900, la cual es una resina de intercambio iónico, se procedió a ampliar su información, para lo cual se realizaron un estudio bibliográfico e isotermas de absorción y desorción.

Una vez caracterizado el soporte se seleccionó un medio de cultivo basandose en el medio CZAPECK modificado para el crecimiento de Asp. niger. Con estos datos se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de Asp. niger en columnas a 35 C y con una humedad inicial del 58 %, variando la relación de nitrógeno orgánico e inorgánico. Teniendo como resultado que la mejor relación fue 50:50 (sulfato de amonio:urea).

Finalmente se llevaron a cabo cinéticas en las cuales se cuantificaron los siguientes parámetros: Humedad, Aw, Caída de presión, Distribución del tamaño de las partículas Diámetro promedio de la distribución, pH, Proteínas y Azúcares totales, Consumo de O₂ y producción de CO₂. Proteína y azúcares, se evaluarón con la finalidad de implementar una técnica sencilla confiable y reproducible, dado que sabemos lo complejo que separar la biomasa de un soporte sólido y medir con precisión la concentración de los azúcares.

PARTE I

INTRODUCCION.

La Fermentación en Estado Sólido (FES) es un tipo de cultivo en donde se crece un microorganismo sobre la superficie y/o en el interior de una partícula porosa sólida (porosidad intrapartícula); esta partícula puede ser asimilable o inerte. El agua está ligada al interior de la matriz porosa y no se observan fenómenos macroscópicos de drenaje entre partículas (porosidad -- interpartícula). El espacio intrapartícula está ocupado por aire, dado que, los microorganismos necesitan oxígeno para crecer y para asegurar su adecuada disponibilidad este puede alimentarse convectivamente.

Esta característica es importante ya que el microorganismo se encuentra en contacto con el aire: a diferencia del cultivo sumergido en donde el contacto es con un medio líquido (de cultivo). En la FES la humedad depende de la capacidad de retención del material el cual debe de tener entre un 30 a 80% (humedad base húmeda).

La FES ha sido usada desde hace muchos años para la obtención de algunos alimentos fermentados, en la maduración de quesos y en la degradación de algunos compuestos lignocelulósicos (composteo). Esto principalmente en países orientales, después de la segunda guerra mundial la FES fue remplazada por la fermentación de cultivo sumergido en los países occidentales. A pesar de que la FES se utiliza en menor proporción que la fermentación en estado líquido, su importancia económica no es pequeña: más del 50 % de las enzimas producidas en el Japón se obtienen por esta técnica. En el futuro el crecimiento global de la bioindustria permite predecir que habrá espacio para el desarrollo de nuevas técnicas de fermentación. La FES puede jugar un papel importante debido a que presenta algunas ventajas, Hesseltine (1972), comparándola con la fermentación líquida tales como:

- a) Condiciones de esterilidad menos estrictas.
- b) Productos más concentrados.
- c) Algunos residuos no necesitan tratamiento.
- d) Una técnica simple.
- e) Bajo capital de inversión.
- f) Reducidos requerimientos de energía.

pero también presenta limitaciones por ejemplo:

- a) Control de los parámetros de fermentación
- b) Poco conocimiento tecnológico.
- c) Acumulación de calor metabólico.
- d) Escalamiento de reactores.

Siendo este último, uno de los principales problemas que le ha impedido a la FES ser funcional a nivel industrial. Se ha visto que la FES puede ser muy útil, pero faltan conocimientos tanto a nivel básico como a nivel tecnológico para una aplicación a nivel industrial.

ANTECEDENTES.

En los últimos años la FES ha recibido mucha atención por muy diversos investigadores e instituciones de todo el mundo y a la fecha los trabajos publicados dejan ver que la FES cada vez se ve más estimulada por los progresos logrados. En 1970 se pronostica que la FES puede ser una alternativa viable a la convencional fermentación sumergida. El término FES se refiere al crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos texturizados y porosos, en presencia de agua en forma absorbida dentro del sólido. Un ejemplo es la fermentación de productos agrícolas con alto contenido de carbohidratos que mediante un proceso de FES ofrece favorables ventajas sobre las fermentaciones convencionales como: mejores rendimientos, disminución en el tamaño y costo del equipo y en algunos casos no se requieren procesos de separación posteriores al proceso fermentativo.

La idea de practicar cultivos en medio sólido sobre soportes impregnados a sido llevada a cabo por algunos autores. Lakshmirayana et al (1975) los cuales produjeron ácido cítrico a partir de melaza absorbida sobre bagazo de caña con Asp. niger. Sato et al (1983) utilizaron una solución de glucosa absorbida sobre pulpa de madera como modelo para el crecimiento en medio sólido para levaduras. Raimbault (1980) demostró que mediante la FES de Asp. niger sobre almidón de yuca se puede incrementar la proteína de dicho almidón. Barrios et al (1987) utilizó poliuretano de baja densidad y algunos plásticos como soporte para la producción de penicilina mediante la FES, sus resultados mostraron que estos materiales contienen un compuesto inhibitorio para el crecimiento de Asp. niger el cual fue disminuido mediante un tratamiento ácido-base. Oriol et al (1988) observó que utilizando bagazo de caña como soporte e impregnándolo con un medio líquido a base de glucosa y bajo ciertas condiciones de temperatura y pH, la cinética de crecimiento de Asp. niger se ve afectada principalmente por la cantidad inicial de agua del medio, la cantidad de esporas con las que se inocula y el tamaño del soporte utilizado.

En otra modalidad de estudios de la FES, se ha tratado de obtener soportes modelo esto es que no presenten interacciones con el microorganismo, para así poder incorporar conocimientos más precisos con respecto al crecimiento. Al respecto se han desarrollado los siguientes trabajos entre otros: el modelo de un nutriente simple que es agar en una caja de petri.

Para éste modelo teórico de crecimiento del hongo se le incorporaron los efectos de transferencia de masa y calor por Georgiuo y Shuler (1986). Wei et al (1981) usaron gelatina como un agente solidificante para producir un sustrato modelo semi-sólido, tratando de tener características muy similares a la FES. Con este soporte se facilita el estudio de las cinéticas de crecimiento midiendo directamente la biomasa dado que la gelatina es disuelta aumentando ligeramente la temperatura y la biomasa es recuperada por centrifugación. Mitchell et al (1986) proponen un sustrato modelo que se diferencia del de Wei et al (1981) por que proporciona una mayor rigidez a la temperatura ambiente usando un agente solidificante que es la Kappa-Carragenan. En su estudio se comparan el crecimiento en su sustrato y en tubérculos de yuca, teniendo un menor rendimiento proteico en su sustrato modelo, por lo que este sustrato modelo aún esta sujeto a estudios de efectos nutricionales.

Además de los parámetros óptimos de crecimiento así como el estudio de soportes modelo, también se han estudiado algunos parámetros físicos como la importancia del agua en la FES. Está a sido estudiada recientemente bajo aspectos cuantitativos (Nisho et al 1979; Raimbault y Alazard 1980; Hoekim et al 1985). El concepto de Aw (actividad del agua) fue propuesto por Narahara et al (1982) el cual es un parámetro representativo para expresar la limitación de agua ausente en el crecimiento para explicar el crecimiento de los hongos en sustrato sólido. Oriol et al (1988) observó el efecto de la Aw durante la fermentación de almidón de yuca con Asp. niger y mediante un cálculo teórico basado en la ecuación de Ross demostró que la Aw del sustrato decrese hasta 0.85 casi al final de la fermentación. La Aw fue incrementada cuando se utilizó bagazo de caña como los mayores rangos de crecimiento y conversión de sustrato a biomasa fueron obtenidos con éste sistema, confirmando que la disponibilidad del agua es un factor crítico en la FES de sustratos almidonados ya que estos tienen una mayor capacidad de retención de agua.

OBJETIVOS 1

OBJETIVO GENERAL.

Seleccionar un soporte teóricamente "ideal", biológicamente inerte, bien definido tanto a nivel de los parámetros físicos (Forma, Porosidad, Densidad) como a nivel químico (pH, Selectividad iónica), que pueda servir en el futuro como un soporte modelo para estudios básicos de FES.

OBJETIVOS PARTICULARES.

PRIMERA PARTE:

Para escoger un soporte modelo haremos diferentes comparaciones de los soportes escogidos estas comparaciones son:

A) Estudio bibliográfico para conocer un máximo de parámetros físicos y químicos de los diferentes soportes.

B) Analizar si existen inhibidores del crecimiento para el microorganismo Asp. niger Y si existen, tratar de disminuir su efecto mediante algún tratamiento.

C) Efectuar diferentes pruebas para el análisis físico como: Drenaje, capacidad de absorción y ocupación de los volúmenes (sólido, líquido y gaseoso) en el reactor.

SEGUNDA PARTE:

En función de los análisis físicos y la presencia o ausencia de inhibidores seleccionar uno de los soportes.

A) Cuantificar de manera precisa el crecimiento de Aspergillus niger, sobre el soporte seleccionado mediante la cuantificación de proteínas y azúcares, además de cuantificar la humedad, la actividad del agua, la caída de presión, la distribución del tamaño de partícula, el diámetro mediano de partícula, el pH, el consumo de Oxígeno y la producción de dióxido de carbono.

B) Analizar e interpretar los resultados del crecimiento de Aspergillus niger sobre el soporte modelo escogido.

PARTE II

**CARACTERIZACION FISICA Y
BIOLOGICA DE LOS SOPORTES.**

Sabemos que existen muchos parámetros fisicoquímicos para caracterizar un soporte adecuado para la FES. La multitud de estos parámetros hace difícil escoger un soporte ideal. En función de lo anterior, nosotros hemos escogido solo tres parámetros que nos parecen los más convenientes, para poder decir si un soporte tendrá las características adecuadas para ser usado en FES.

En esta parte se pretende analizar algunos efectos biológicos y físicos de los soportes en estudio. Con respecto al aspecto biológico pretendemos observar si este ejerce algún efecto inhibitor sobre la velocidad de crecimiento de Asp. niger cepa 10 UAM-I. En el aspecto físico deseamos conocer las características de absorción máxima del soporte sin que éste presente fenómenos macroscópicos de drenaje (el volumen de agua por volumen de reactor deberá de ser máximo)

A) DESCRIPCION DE LOS DIFERENTES SOPORTES

S 1 PRESENTACION DE LOS SOPORTES.

1.- El hecho de escoger estos soportes tiene como fundamento que:

- Son disponibles comercialmente.
- Son inertes biológicamente (apriori).
- Pueden retener una alta cantidad de agua.
- Poseen algunos parámetros fisicoquímicos ya conocidos.

2.- Los diferentes soportes utilizados en este estudio son:

- 1.- Espuma de poliuretano de baja densidad. (PO-1)
- 2.- Espuma de poliuretano de alta densidad. (PO-2)
- 3.- Esponja de celulosa. (ES-1)
- 4.- Fibra sintética de celulosa. (FI-1)
- 5.- Resina de intercambio iónico (Amberlita IRA-900).

A continuación se muestran fotografías al microscopio de cada uno de los soportes arriba mencionados.

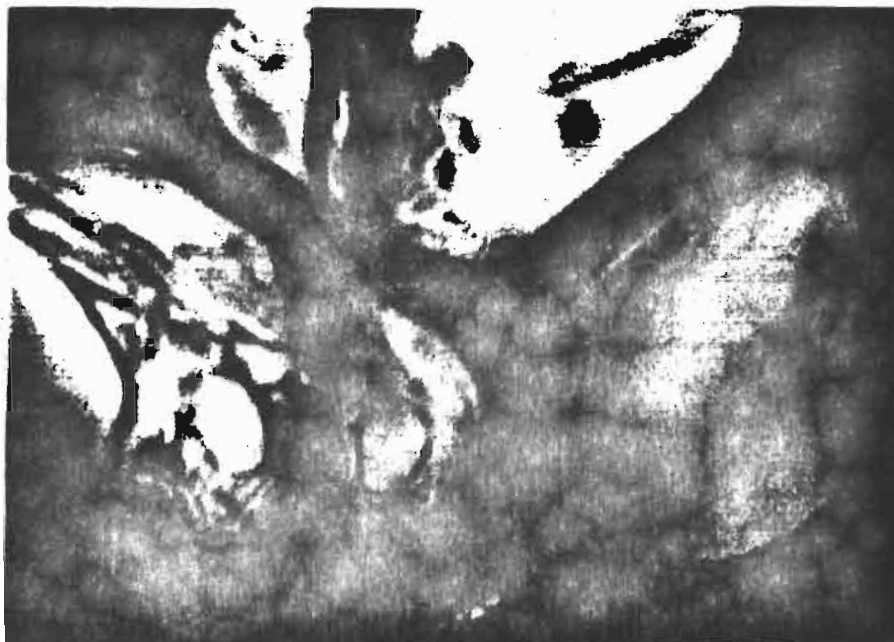


Foto No 1. Nos muestra al Poliuretano de baja densidad (PO-1), se puede observar que el tamaño es grande e irregular, no presenta una estructura fibrosa. Escala de referencia 1cm representa 37.5 micras aproximadamente.

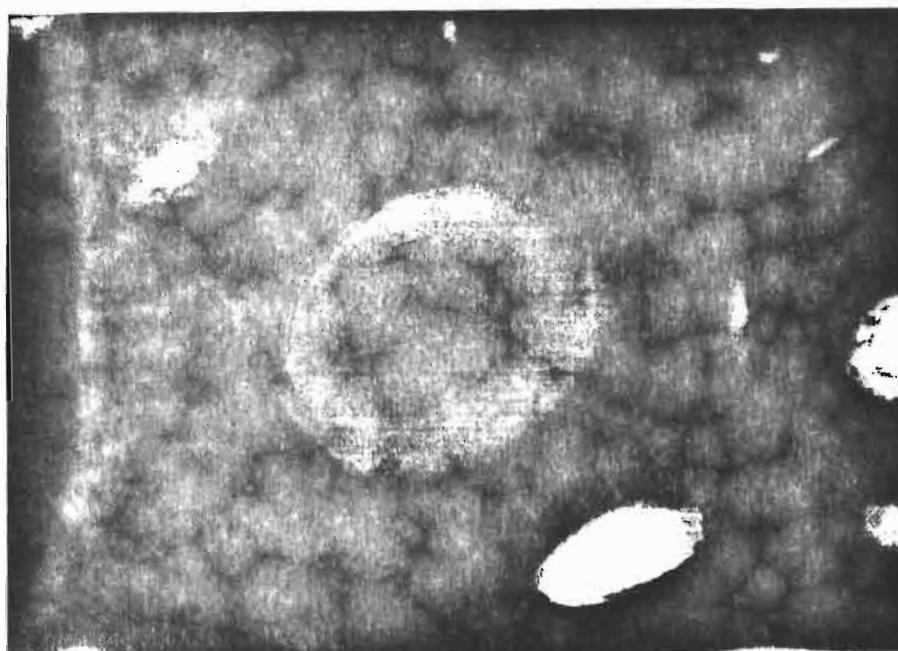


Foto No 2. Poliuretano de alta densidad (PO-2), se puede ver que el tamaño de poro es más pequeño que el del PO-1, este poliuretano es más compacto. Escala de referencia 1cm equivale a 50 micras.

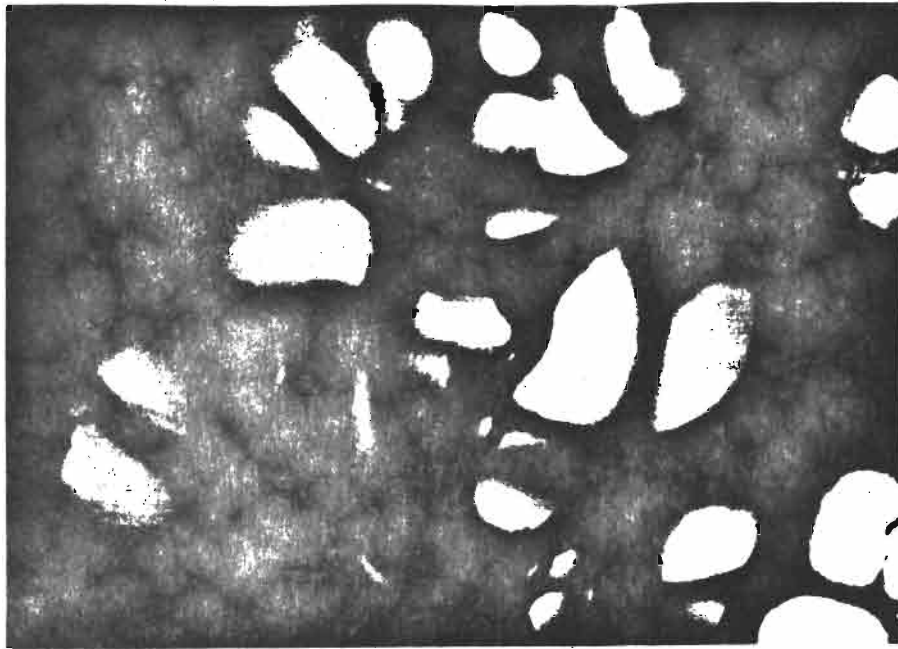


Foto No 3. Esponja de celulosa (ES-1), la cual posee una estructura de forma irregular, con un tamaño de poro pequeño en forma oval en algunos casos. Escala 1cm representan 32 micras aproximadamente.



Foto No 4. Fibra sintetica de celulosa , tiene una estructura fibrosa, la cual presenta espacios entre fibras se puede considerar a las fibras como cilindros que tienen un diametro promedio de 10 micras. Escala de referencia 1cm representa 26 micras.

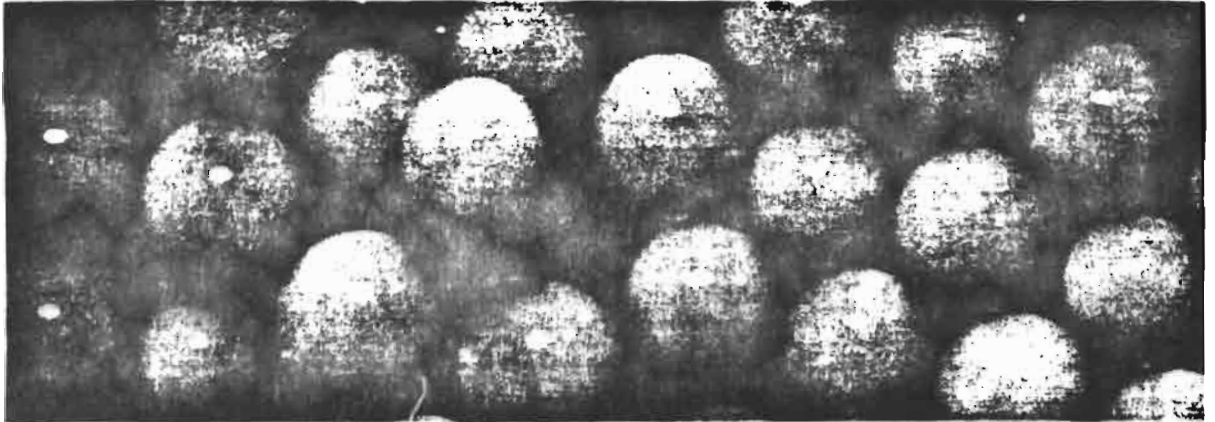


Foto No 5. Resina macrorreticular de intercambio iónico (amplificada 50 veces su tamaño aprox.). Se puede observar que presentan una forma definida de esfera con un tamaño de partícula también definido. Cortesía de Rohm and Hass. Philadelphia. 1987.

9.2. PARAMETROS FISICOQUIMICOS DE LOS SOPORTES

Los parámetros fisicoquímicos que conocemos para los diferentes soportes son:

- Espuma de poliuretano de baja densidad (PO-1): (17 Kg/m³), sin colorante, sintético, hidrofóbico, poroso (98 % en volumen), densidad real de la estructura (1.1 g/cm³) compresible y sin posibles elementos aprovechables por el microorganismo.

- Espuma de poliuretano de alta densidad (PO-2), (120 Kg/m³), con colorante sintético, hidrofóbica, porosa (88 % en volumen), poco compresible, densidad real de la estructura (1.1 g/cm³) y sin posibles elementos aprovechables por el microorganismo.

- Esponja de celulosa comercial (ES-1): con colorante, higroscópica, porosa, compresible y con posibilidad de degradación de la estructura de este soporte por el microorganismo, densidad real de la estructura 1.5 g/cm³.

- Fibra de celulosa comercial (FI-1): Con colorante, higroscópica, porosa, poco compresible y con posibilidad de degradación de su estructura, densidad real de su estructura 1.5 g/cm³.

- Resina de intercambio iónico (AMB-IRA-900): Sin colorante, higroscópica, de forma esférica, con una porosidad bien definida y sin posibles elementos utilizables por el microorganismo.

B) ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LOS SOPORTES

S 3 JUSTIFICACION.

Como ya se ha dicho anteriormente el soporte que deseamos, debe de presentar como característica el no interactuar con el medio de cultivo, ni con el hongo utilizado.

S 4 PRINCIPIO DEL EXPERIMENTO.

Esta parte del experimento se llevara a cabo a nivel de caja de petri, mediante la cuantificación del diámetro cuadrado del crecimiento de Asp.niger cepa UAM-10 comparándose con un estandar (bagazo), para así poder determinar cualitativamente si el soporte interviene de alguna manera durante el crecimiento del hongo.

S 5 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION.

1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.

La medida del diámetro cuadrado, se realizó a nivel de caja de petri de 10 cm de diámetro, las cuales contenían al soporte molido mezclado con un medio de cultivo estéril. Una vez inoculado las cajas se colocaron dentro de una incubadora a una temperatura de 32 °C, a las que se les fue midiendo el diámetro en función del tiempo. En la figura. 5.1 se puede observar el equipo utilizado.

INCUBADORA DE TEMPERATURA REGULABLE.

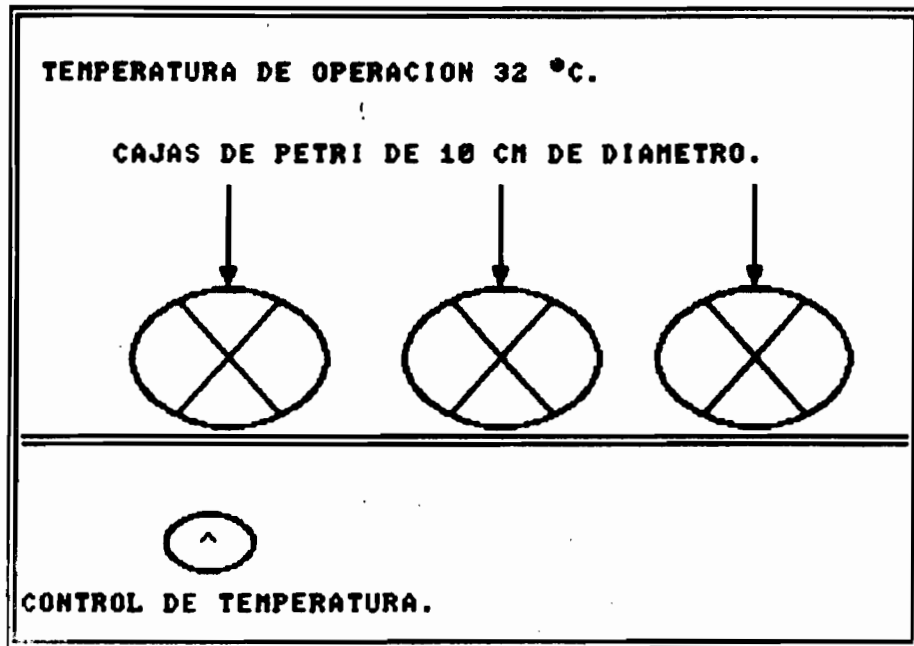


Fig. 5.1 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL UTILIZADO.

2.- MEDIDA DEL DIAMETRO DE CRECIMIENTO.

El hongo se desarrolla en las cajas formando lo que se conoce como colonia, generalmente en forma de circunferencia. De ahí partimos para medir el diámetro horizontal y vertical, promediarlos y elevarlos al cuadrado teniendo así el diámetro cuadrado de crecimiento del hongo. Esta medida se realizó con una regla transparente y para verificar con un vernier. Las medidas se realizaron para todos los soportes utilizados y correlacionándolos con una muestra control en cada uno de los experimentos.

3.- MODO DE OPERACION

Primeramente se partió de un cultivo semilla de Asp. niger, cepa UAM-10 que sirvió para inocular nuestras cajas.

Cada uno de los soportes fueron molidos en un molino de sólidos malla 50, teniendo así un tamaño de partícula uniforme. Los soportes molidos fueron secados en una estufa a 60 °C durante 48 horas. Posteriormente se toma un gramo de soporte seco y molido el cual se mezcla con 50 ml de medio Papa Destroxa Agar (PDA), se colocan en matraces erlenmeyer de 250 ml y se esterilizan a 110 lb de presión durante 15 min. Luego en condiciones estériles se vacían en cajas de petri de 10 cm de diámetro previamente esterilizadas y se deja solidificar a temperatura ambiente. Finalmente se inoculan con Asp. niger por picadura en el centro y se incuban a 32 °C. En función del tiempo se va midiendo el diámetro de crecimiento del hongo.

Con lo que respecta al tratamiento de los soportes éste se realizó con: HCl, NaOH, NH₄OH. Consiste en lavar los soportes de la siguiente manera. Se toma 1 g de soporte seco y se le agregan 100 ml de la solución con la que se desea tratar al soporte y se somete a agitación mecánica mediante un caframo a 40 rpm durante 1 hora aproximadamente. Posteriormente se enjuaga con agua corriente hasta que el pH del agua de enjuague sea igual al del agua corriente, una vez lavado se seca el soporte nuevamente a 60 °C durante 48 horas y se proceden a utilizar como anteriormente se mencionó. A la amberlita no se le dio tratamiento, por que la resina a ser tratada con HCl o con NaOH es regenerada es decir que sus cargas de intercambio son renovadas.

5 6 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Las figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6 representan el diámetro cuadrado en función del tiempo de crecimiento, para los diferentes soportes evaluados.

En función de los resultados obtenidos podemos efectuar el siguiente análisis. Con respecto a los poliuretanos (fig. 6.1 y 6.2) el mejor crecimiento se obtuvo con el poliuretano sin tratamiento, seguido por los tratamientos con bases (NaOH y NH₄OH) aunque el crecimiento es ligeramente más rápido en el PO-1 ya que se llega al mismo nivel con una diferencia de 20 horas aproximadamente.

Mientras que para la esponja el crecimiento es casi nulo cuando no hay tratamiento. Posteriormente se logra tener un incremento de la superficie hasta tener un máximo de 6 cm (fig. 6.3) lo cual tan solo representa un 10 % del crecimiento registrado en el patrón, por lo que aun con el tratamiento con HCl el crecimiento es muy poco.

La fibra también presenta un crecimiento muy pobre cuando no ha recibido tratamiento (fig. 6.4), posteriormente el mejor tratamiento fue con NH₄OH y se logro incrementar en un 100 % el crecimiento pero aun así tan solo es el 60 % aproximadamente del crecimiento registrado con el patrón.

Finalmente con la amberlita (fig. 6.5), se tiene un crecimiento muy similar al obtenido con el patrón (bagazo de caña) en un tiempo similar, ya que los poliuretanos también alcanzan este nivel de crecimiento (fig. 6.6).

En la (fig. 6.6) se puede observar una comparación del diámetro cuadrado de crecimiento para seis soportes (PO-1, PO-2, ES-1, FI-1, AMB. IRA-900 Y BAGAZO) escogidos. A simple vista podemos decir que la esponja y la fibra tienen un pobre crecimiento comparandolos con los demás soportes. Como una respuesta de estos experimentos podemos decir que la fibra y la esponja presentan factores de inhibición sobre el crecimiento de *Asp. niger* y este se ha mejorado por un tratamiento. Ya que solo medimos un parámetro proporcional a la superficie de crecimiento del microorganismo el cual es el diámetro cuadrado. Por este hecho no tenemos una respuesta directa para poder decir cual de los soportes es el más eficiente a nivel de crecimiento, para dar una respuesta concreta necesitamos cuantificar la biomasa en función del tiempo. Hemos tratado de cuantificar la biomasa sobre fibras y esponjas mediante (Lowry, Micro Kjendalk y peso seco), pero dado que el crecimiento es bajo. Los resultados obtenidos no eran representativos debido a la dispersión que presentaban. Barrios (1987) reporto los problemas que se

pueden encontrar durante la cuantificación de biomasa utilizando el método de Lowry, el observó que existe interferencia entre el método y un poliuretano sintético.

En conclusión si este estudio no permitio determinar totalmente si *Asp. niger* crecio más sobre alguno de los soportes seleccionados, al menos permitio observar que algunos soportes necesitan de un tratamiento, para que el hongo pueda crecer y algunos otros no. Esto nos hace suponer que este tipo de soportes (sin tratamiento) no presenta inhibidores para el crecimiento del hongo. Lo cual resulta interesante para nuestros objetivos de trabajo.

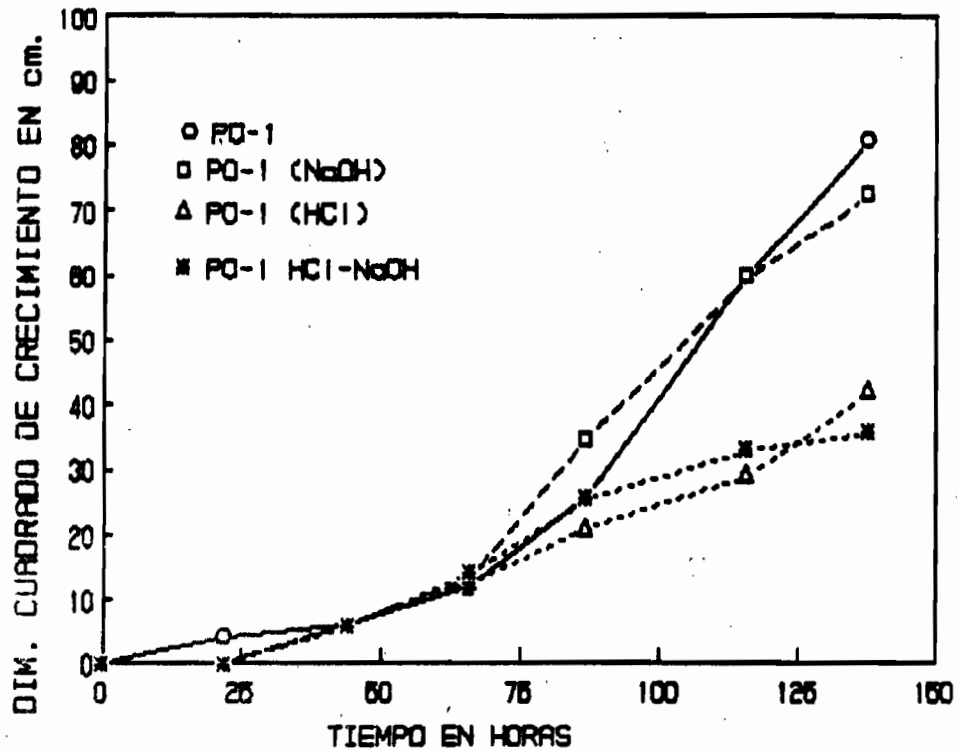


FIG. 8.1 CURVA DE CRECIMIENTO SOBRE POLIURETANO 1.

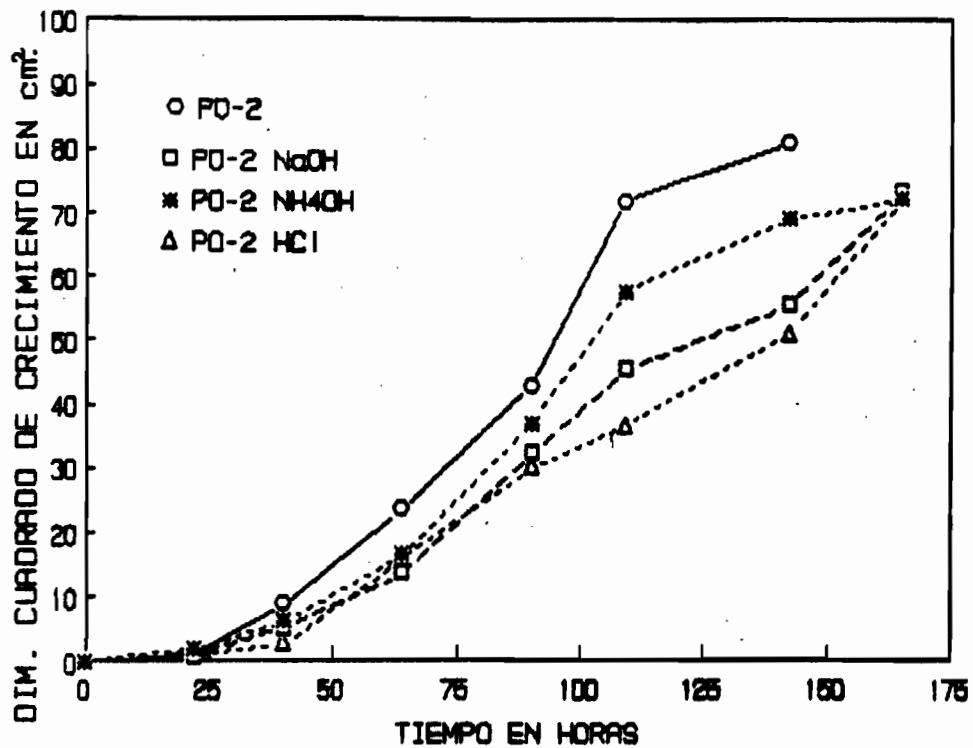


FIG. 6.2 CURVA DE CRECIMIENTO SOBRE POLIURETANO 2.

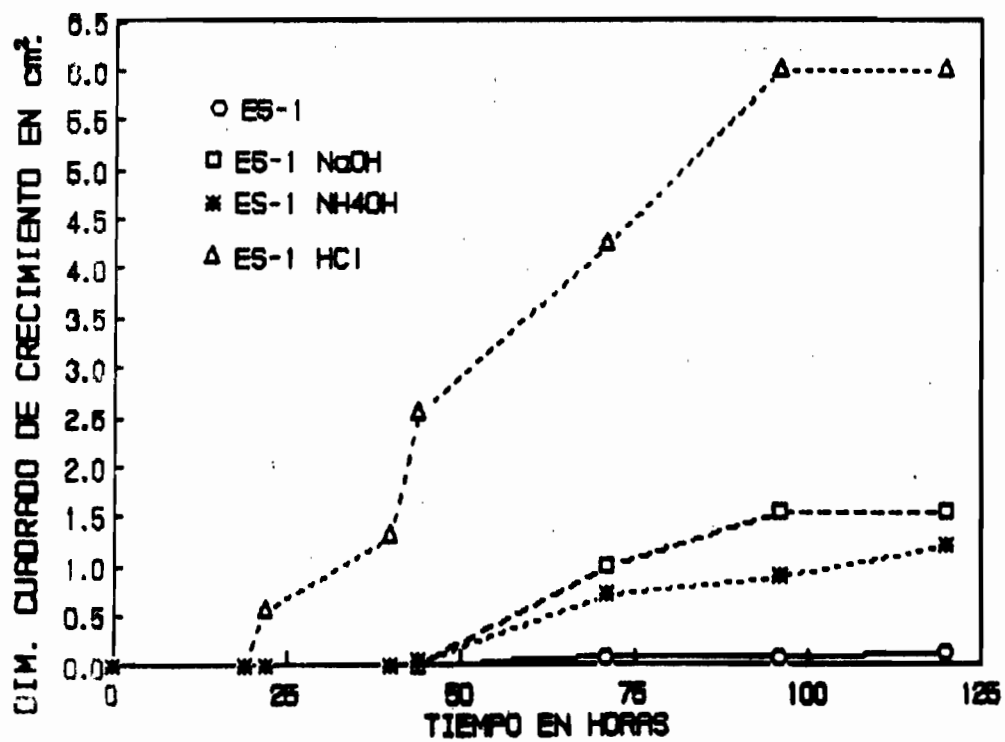


FIG. 6.3 CURVA DE CRECIMIENTO SOBRE ESPONJA I.

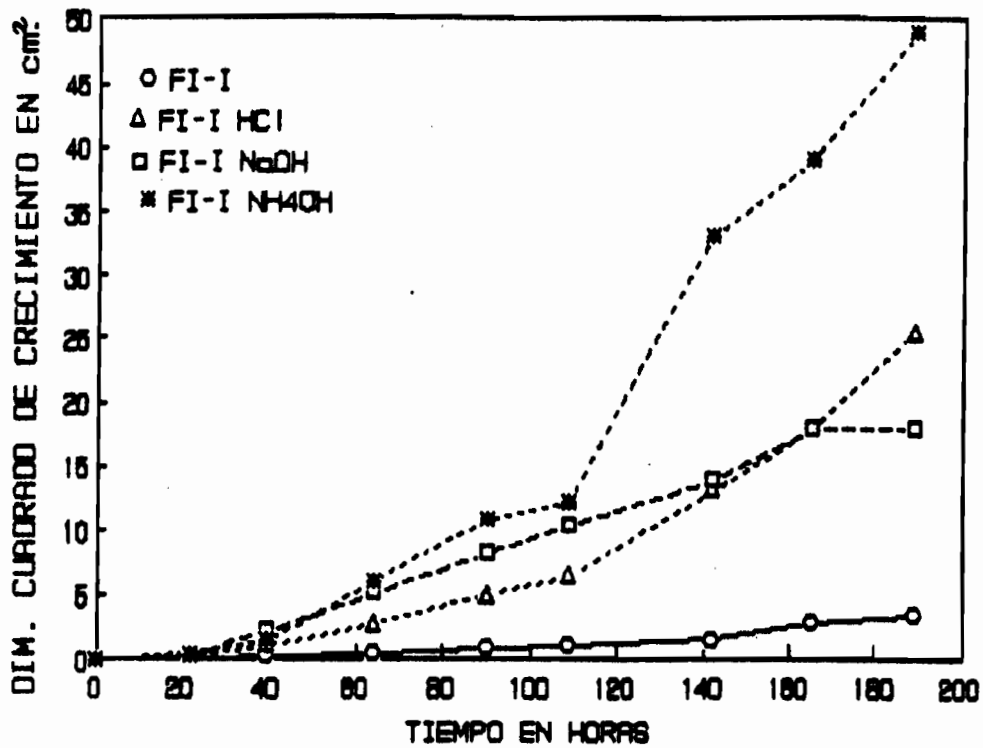


FIG. 8.4 CURVAS DE CRECIMIENTO SOBRE FIBRA DE CELULOSA.

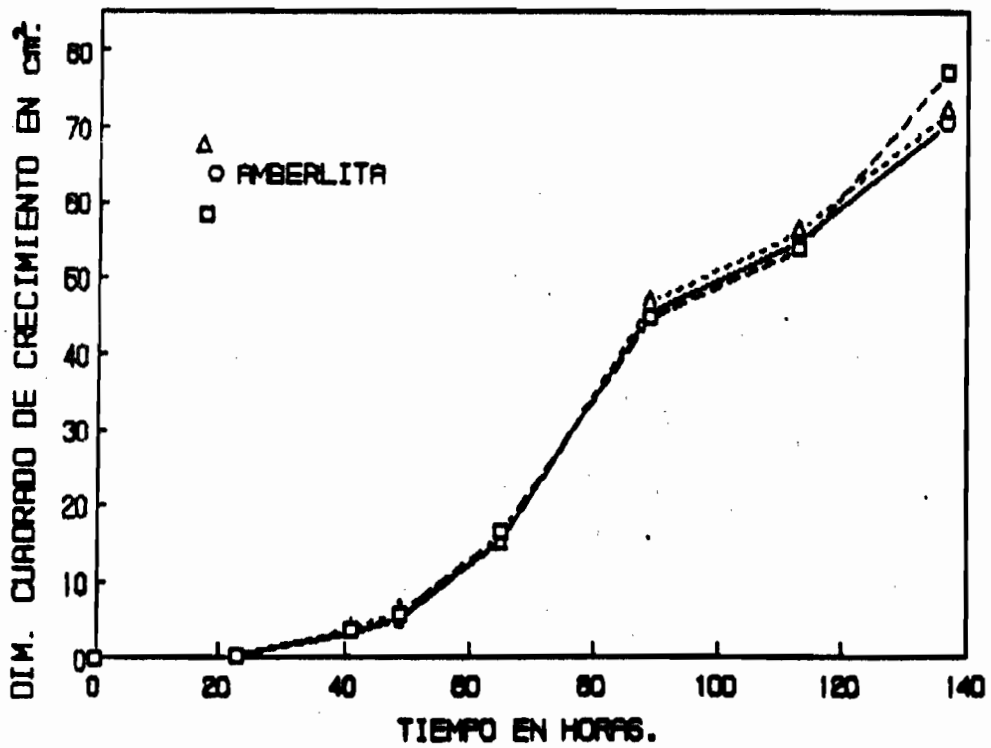


FIG. 8.5 CURVA DE CRECIMIENTO SOBRE AMBERLITA.

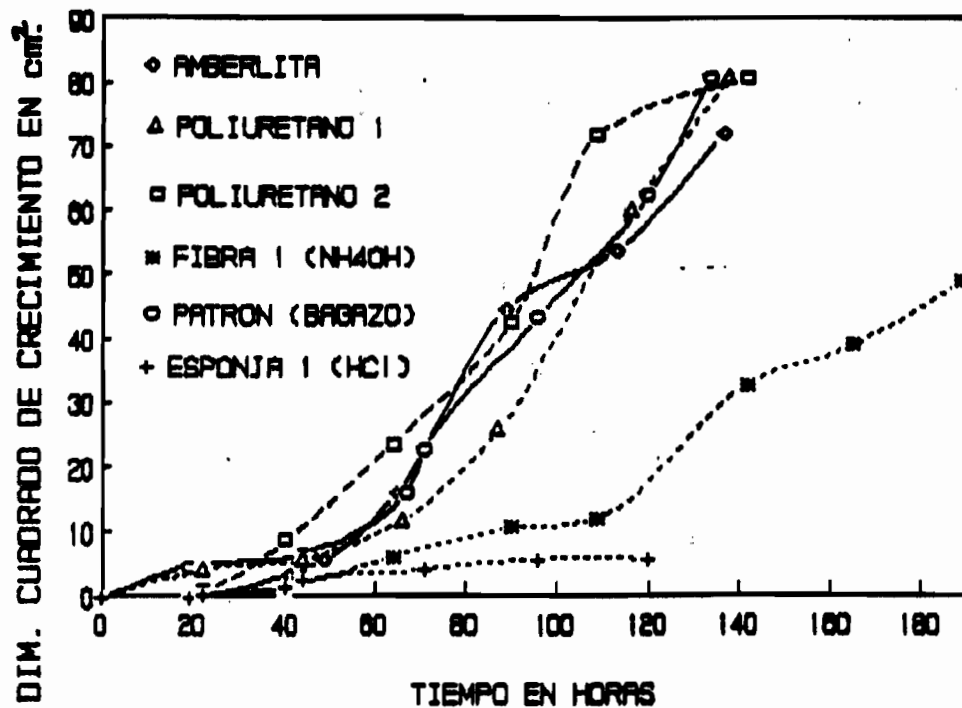


FIG. 6.6 COMPARACION DEL CRECIMIENTO CON LOS DIFERENTES SOPORTES.

Las columnas son colocadas en una cámara de saturación, la cual contiene un volumen de agua que ocupa la parte baja. Dicha cámara se coloda dentro de una incubadora a 32 °C con este sistema nos acercamos a un 100 % de humedad relativa en la cámara.

INCUBADORA DE TEMPERATURA REGULABLE.

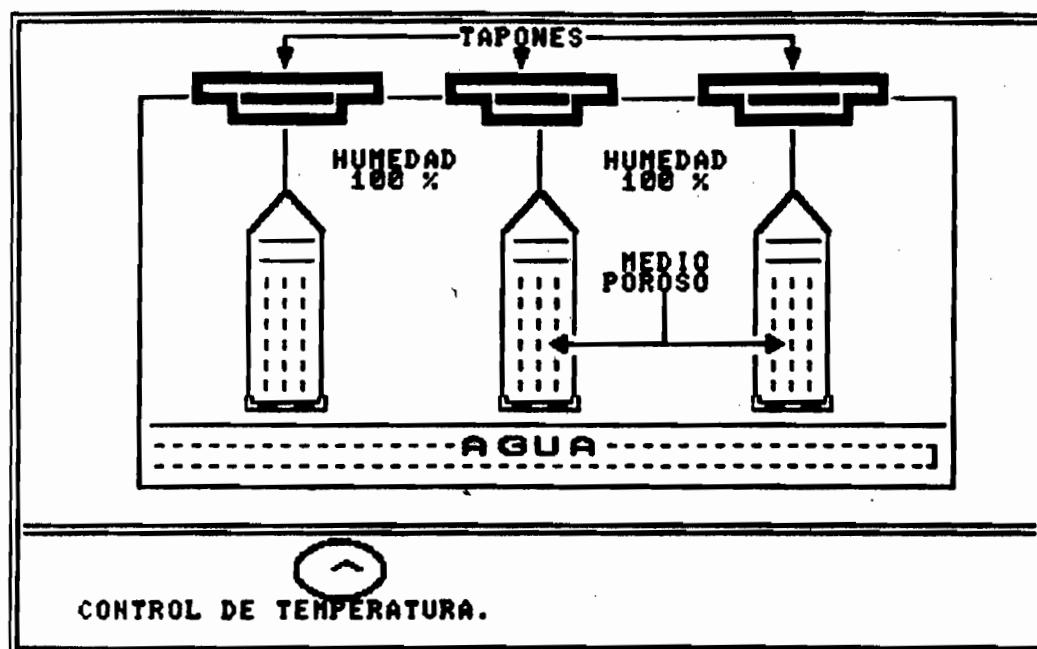


Fig. 9.1: DISPOSITIVO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA EL EXPERIMENTO DE DRENAJE DE LOS DIFERENTES SOPORTES.

2.- MEDIDA DE LA HUMEDAD.

La humedad fue medida mediante diferencia de pesos. La muestra es pesada en una balanza digital registrando así el peso húmedo. Luego la muestra es secada a 60°C durante 48 horas teniendo así el peso del soporte seco. Entonces la humedad se cuantifica mediante la siguiente relación:

$$W = \frac{M \text{ H}_2\text{O}}{M \text{ TOTAL}} \times 100 \quad \dots\dots (1)$$

Donde: M H₂O es el peso del agua en gramos.

M TOTAL es el peso del agua + el peso del soporte seco en gramos.

3.- MODQ DE OPERACION.

Los soportes previamente deberán estar molidos y secos como anteriormente se ha descrito. Para cuantificar la humedad inicial del soporte. Se toman 3 gramos de soporte se depositan en una caja de petri de 20 cm de diámetro. Se coloca sobre una balanza digital y se procede a agregar agua destilada lentamente mezclando continuamente hasta el valor de humedad deseado. Una vez determinada esta humedad inicial, se toman 5 gramos de soporte seco y molido se le agrega agua hasta tener la humedad deseada y se empaca en las columnas de vidrio evitando que haya escurrimiento por compactación. Una vez empacada la columna se tapa con un tapón de aluminio en la parte superior y se introducen en la cámara de saturación. Esta se pone dentro de la incubadora a 32°C durante 20 horas, al término de este tiempo se saca la muestra y se mide la humedad. Para medir la humedad se toman seis muestras a diferentes niveles del tubo y se procede a pesar cada muestra y mediante diferencia de pesos conocemos la humedad.

3 10 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Dentro de nuestro desarrollo experimental hemos visto que los gradientes de humedad en el reactor son perjudiciales a nuestros objetivos, por tal efecto mediante el fenómeno de saturación hemos tratado de llegar al punto de equilibrio entre la fuerza de retención (capilaridad) y la fuerza de gravedad, si llegamos al equilibrio entre estas fuerzas no habrá gradientes de humedad y no tendremos drenaje.

Las variables utilizadas son las siguientes:

W_i = Humedad inicial.

W_f = Humedad final.

V_{li} = Volumen líquido inicial.

V_{lf} = Volumen líquido final.

V_s = Volumen sólido.

Los volúmenes se calculan de la siguiente manera:

$$\text{Volumen líquido (V}_{li}\text{)} = \frac{\text{Masa del líquido.}}{\text{Densidad real del líquido.}}$$

$$\text{Volumen sólido (V}_{s}\text{)} = \frac{\text{Masa seca del soporte.}}{\text{Densidad real del soporte.}}$$

1.. Caso del Poliuretano 1 (PO-1)

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE SATURACION.

En el caso del PO-1 para el estudio de la humedad de saturación, la humedad inicial (W_i) fue del 95.8 % la cual representa la humedad de absorción máxima del soporte. En la (fig. 10.1) se pueden ver diferentes resultados experimentales de humedad final (W_f) después de 20 horas. Existe un gradiente axial de humedad en el reactor, este gradiente se da a un nivel entre 0 y 7 cm de altura. Este gradiente se manifiesta en la parte inferior del reactor teniendo una humedad del 86 % en promedio. Esto nos indica un acumulamiento de agua en el fondo del reactor y un escurrimiento del agua durante las 20 horas de experimento a fuera del reactor. Entre 7 y 18 cm de altura del reactor podemos ver que hay una tendencia hacia el equilibrio con una humedad del 67 %.

La (fig. 10.2) muestra las distribuciones de los volúmenes de líquido inicial, final y de sólido en función de la altura. Después de 20 horas en el reactor constatamos que no hay un gradiente axial del volumen de la fase sólida (V_s), que esta ocupación por volumen de reactor es baja (4%) pero homogénea es decir que el empaque del soporte al inicio y durante el proceso se mantiene constante. Después de 20 horas hay un escurrimiento del líquido, de 10 veces mayor con respecto a la parte alta del reactor. La (fig 10.3) representa el balance de volumen de agua inicial y final la cual se obtuvo de la figura 10.2. Observamos que después de 20 horas se escurre más del 50 % del volumen de agua inicial, esto muestra que nos encontramos por encima del punto de equilibrio dentro del reactor.

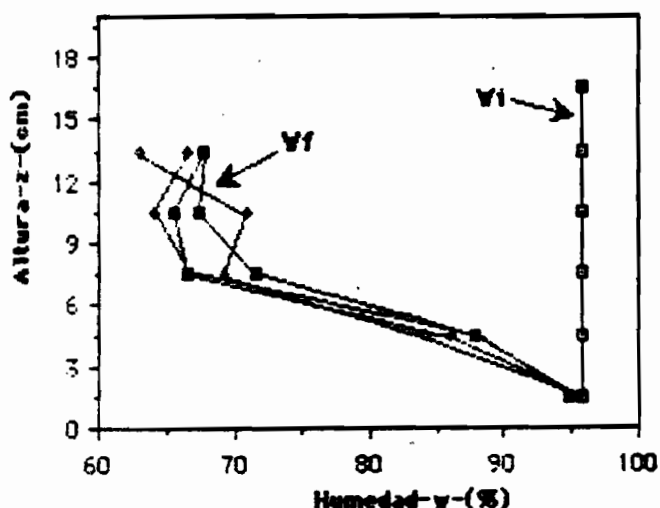


Fig. 10.1 perfiles axiales de humedad, obtenidos con 4 experimentos. Para el PO-1 W_i representa la humedad inicial de absorción máxima del PO-1 y W_f representa la humedad después de 20 horas de experimento.

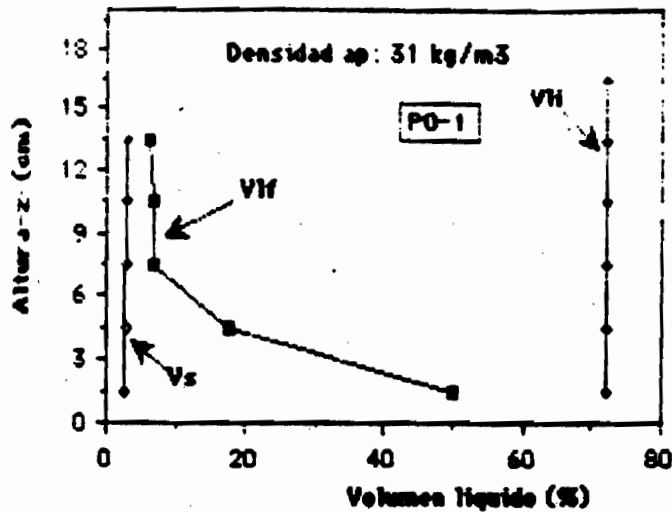


Fig. 10.2 perfiles axiales de los volúmenes del líquido inicial (V_{li}), de sólido (V_s) y de volumen líquido final (V_{lf}) obtenido para el PO-1.

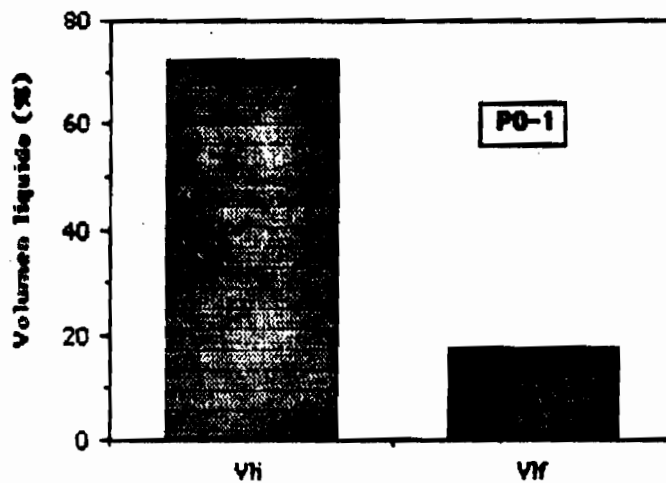


Fig. 10.3 Balance entre los volúmenes de líquido inicial y final para el PO-1.

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE EQUILIBRIO.

Para llegar hasta el valor de la humedad de equilibrio es decir sin gradientes axiales en el reactor. Es necesario realizar varios experimentos en los cuales se les varia la humedad inicial hasta llegar a un valor de equilibrio. La (fig. 10.4) nos muestra el valor de la humedad de equilibrio alcanzado. Este valor fue aproximadamente del 67 % que corresponde a el valor de equilibrio ya encontrado en la (fig 10.1) entre 7 y 18 cm de altura.

En la (fig. 10.5) se puede ver que los volúmenes inicial y final de ocupación de la fase líquida son casi iguales (5.3 % aproximadamente); el volumen de la fase sólida es de un 2 % en promedio. Como se ve en la (fig. 10.6) el volumen de agua inicial y final estan en equilibrio, es decir que no hay escurrimiento durante las 20 horas del experimento. Sin embargo el volumen de agua ocupado es pobre 5 %, el reactor contiene aproximadamente un 93 % de aire.

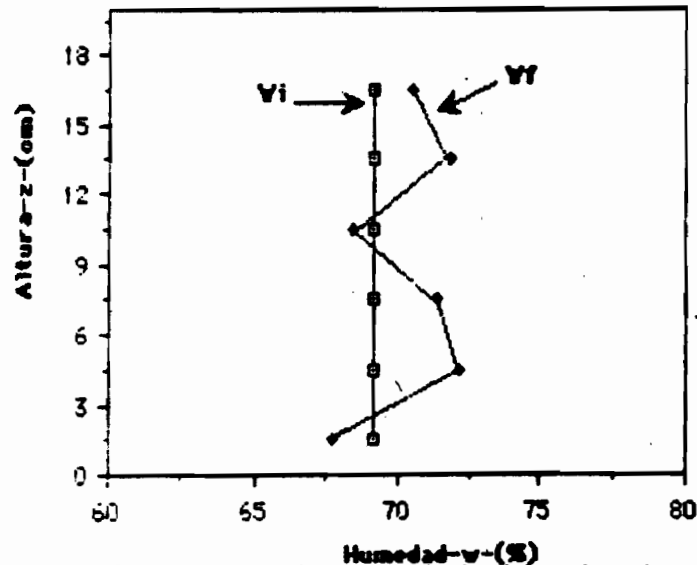


Fig. 10.4 Perfil axial de humedad obteniendo con una humedad inicial del 69 % para el PO-1.

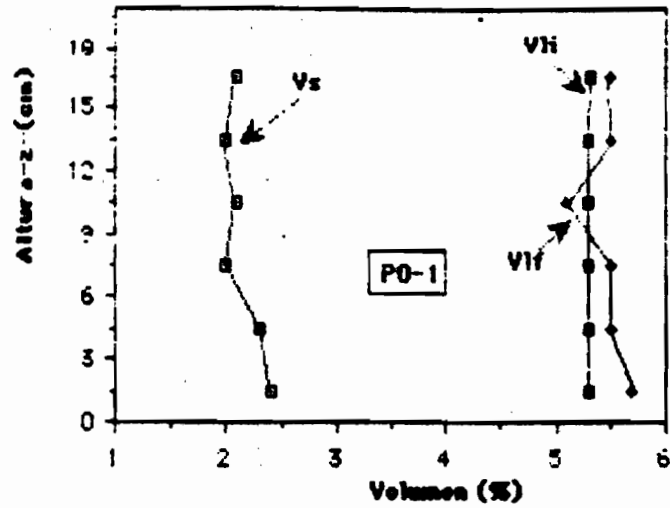


Fig. 10.5 Perfiles axiales de los volúmenes de líquido inicial (Vli), de sólido (Vs) y de líquido final (Vlf) para el PO-1.

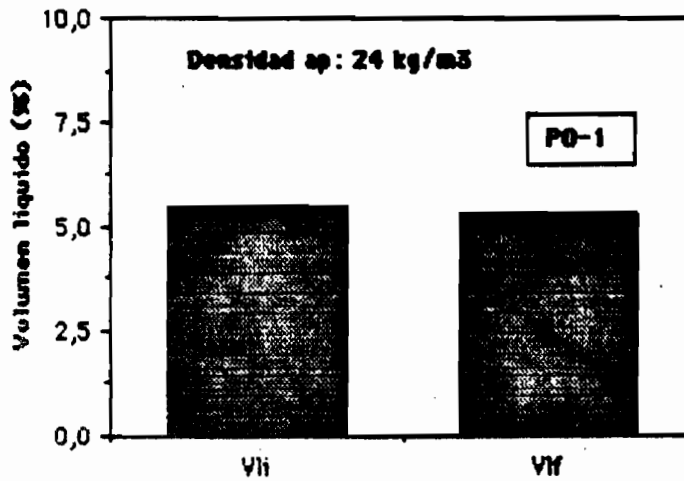


Fig. 10.6 Balance entre los volúmenes de líquido inicial y final para el PO-1.

2 CASO DEL POLIURETANO 2.

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE SATURACION.

En el caso del poliuretano 2 (PO-2) la W_i de saturación fue del 89.3 % (fig. 10.7). Existe un gradiente en la parte baja del reactor entre 0 y 4.5 cm de altura pero es menos drástico que en el caso del PO-1. En la parte superior del reactor entre 4.5 y 18 cm alcanzamos el equilibrio el cual corresponde a una humedad del 64 %. Si analizamos los volúmenes del líquido al inicio y al final tenemos que el V_l es casi constante con un valor de 9 % entre 4.5 y 18 cm. (Fig. 10.8). El volumen sólido (V_s) que ocupa dentro del reactor es ligeramente mayor que en el caso del PO-1. Esto es por la densidad del PO-2 la cual es más alta que en el caso del PO-1.

Haciendo el balance de la (fig. 10.9) tenemos un balance negativo ya que nos encontramos por arriba del valor de equilibrio y en consecuencia perdemos un 30 % de agua en 20 horas aproximadamente.

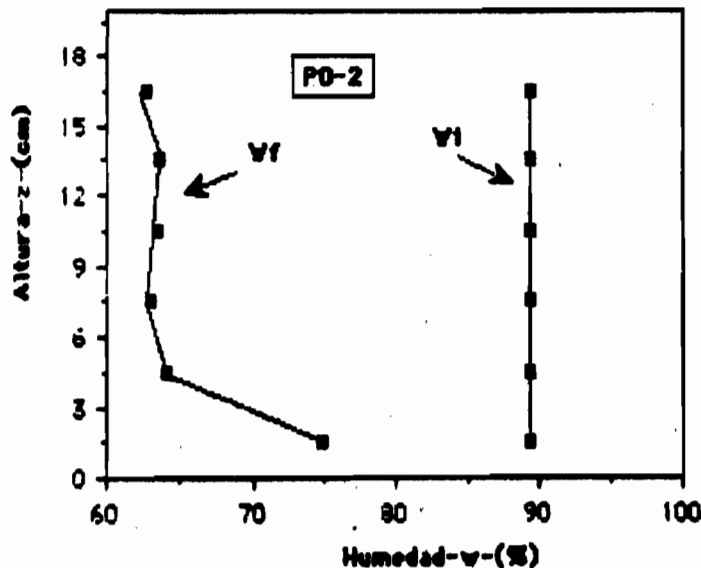


Fig. 10.7 Perfiles axiales de humedad para el PO-2 donde W_i representa la humedad inicial de absorción máxima para el PO-2 y la W_f representa la humedad después de 20 horas de experimento.

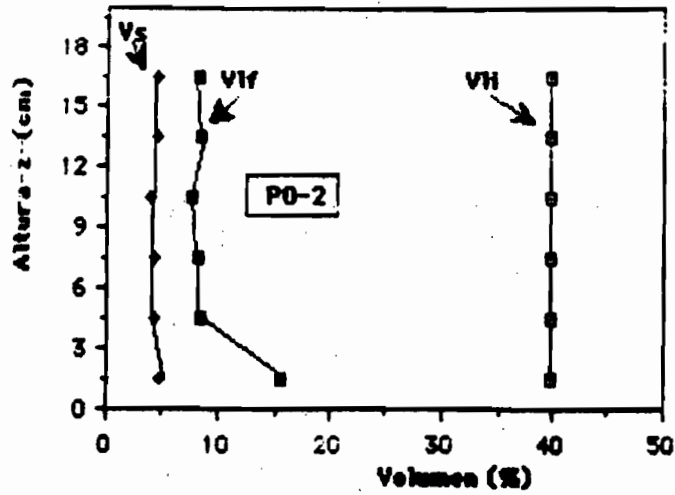


Figura 10.8 Perfiles axiales de los volúmenes de líquido inicial (Vli), de sólido (Vs) y de líquido final (Vlf) para el PO-2.

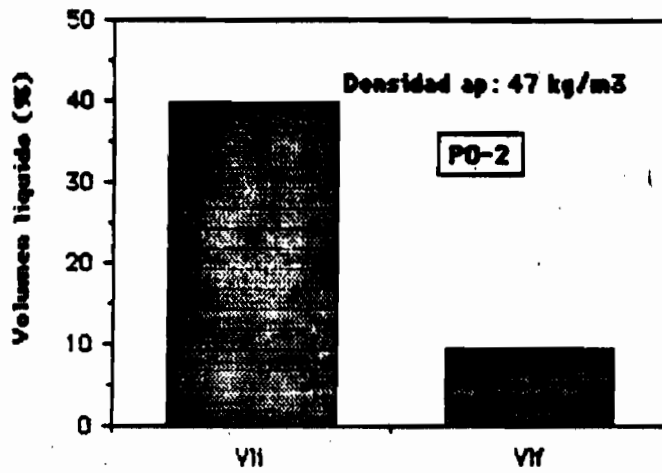


Fig 10.9 Balance entre los volúmenes de líquido inicial (Vli) y final (Vlf) para el PO-2.

*ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE EQUILIBIO.

En la (fig. 10.10) se muestran diferentes corridas con diferentes W_i , todas muestran una tendencia al equilibrio con una humedad final entre el 60 y 65 % aproximadamente. Parece ser que para este soporte existe siempre acumulamiento de agua en la parte baja del reactor, también existe un escurrimiento de agua a fuera del reactor en este caso no llegamos hasta el valor de la humedad de equilibrio pero viendo los porcentajes de volumen de agua (fig. 10. 11) tenemos que el equilibrio puede ser incluido entre 50 y 60 % de humedad. También se observó que el empaque del reactor no es función de la humedad, el volumen de la fase sólida se queda en promedio de un 5 %. Si esto lo traducimos a volumen se vera (fig. 10.11) que el V_{lf} es casi constante a lo largo del reactor 8 % pero si se manifiesta una acumulación del 16 % de agua en el fondo del mismo y el V_s se mantiene con un valor del 5 %. De todo lo anterior se puede decir que la humedad de saturación tiende a un punto de equilibrio en el cual el V_{li} es casi igual al V_{lf} y que es lo que nosotros deseamos.

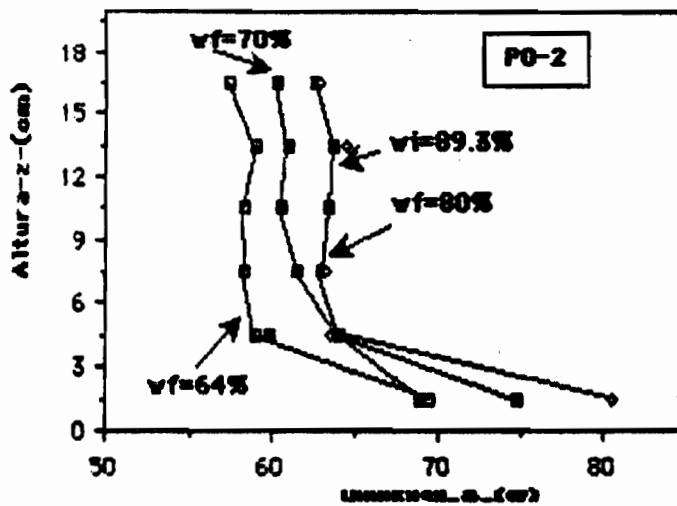


Fig. 10.10 Perfiles axiales con diferentes humedades iniciales (W_i) para el PO-2.

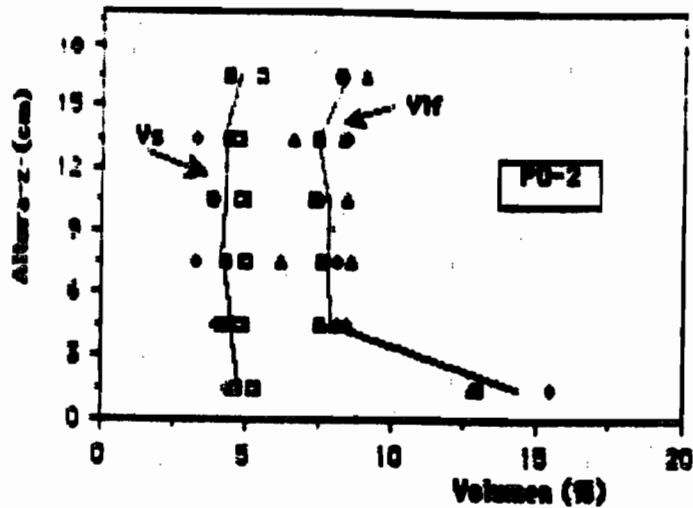


Fig. 10.11 Perfiles axiales de los volúmenes de líquido final (Vlf) y de volumen de sólido (Vs).

3. CASO DE LA FIBRA 1 (FI=1).

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE SATURACION.

En el caso de la fibra (FI=1), solo mostramos el resultado de un experimento (fig. 10.12), en donde empezamos con una humedad de saturación del 90 %. Después de 20 horas se ve claramente la existencia de un gradiente que va desde un 74 % a un 88 %, no es tan drástico como en el caso de los poliuretanos, pero también es claro que no hay una tendencia que defina el punto de equilibrio del soporte. El Vli es del 62 % mientras que el Vlf varía dado el gradiente de humedad. En promedio la pérdida del volumen líquido es del 27 % aproximadamente (fig. 10.13), resultando así un balance negativo. El Vlf fluctúa entre 20 y 50 %, mientras que el inicial es del 64 % y el Vs es del 5 % muy similar al de los poliuretanos. La (fig. 10.14) muestra que durante las 20 horas se escurre casi un 30 % del agua inicial.

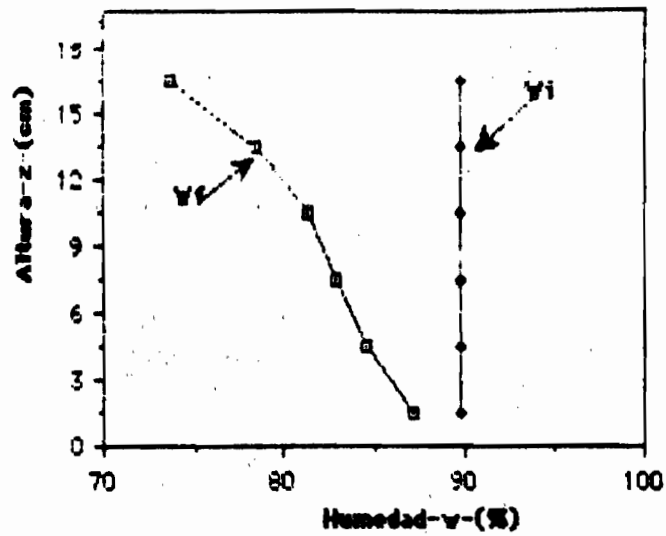


Fig. 10.12 Perfiles axiales de humedad para la FI-1, W_i representa la humedad inicial de absorción máxima de la fibra y la W_f representa la humedad final después del experimento.

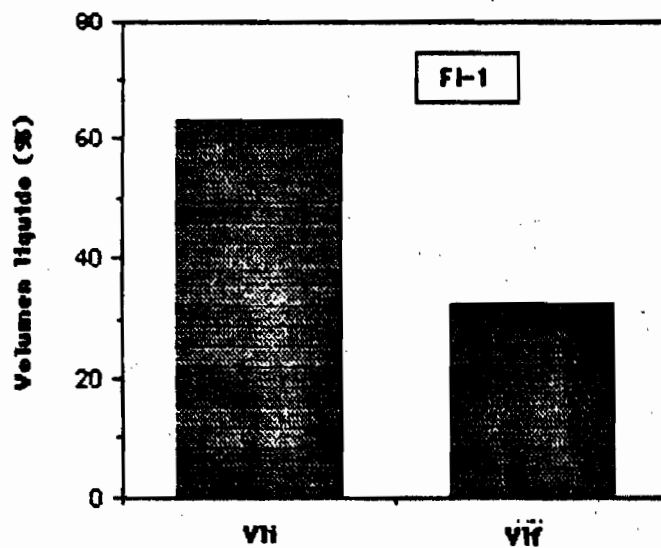


Fig. 10.13 balance entre los volúmenes de líquido inicial y final para la Fibra-1 (FI-1).

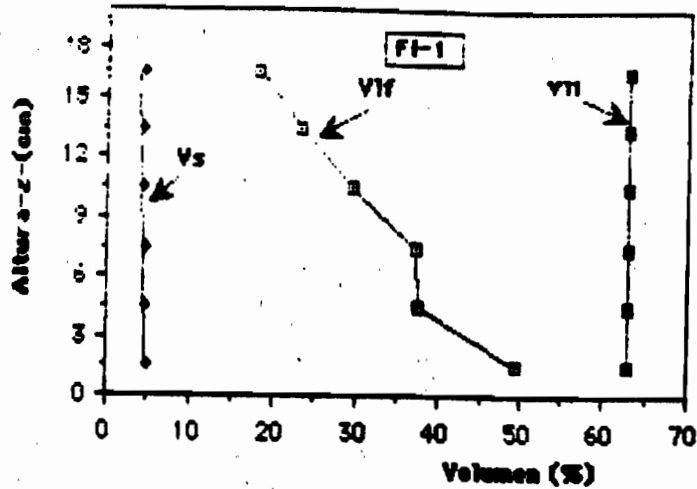


Fig. 10.14 perfiles axiales de los volúmenes de líquido inicial (Vli), volumen de sólido (Vs) y volumen líquido final (Vlf) obtenidos para la (FI-1).

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE EQUILIBRIO.

Realizando una serie de experimentos y teniendo como variable el % W_i , presentamos solo uno de ellos en donde la W_i fué del 70 %. En la figura. 14.15 vemos que la fibra presenta un comportamiento diferente a los otros soportes, ya que en la parte más alta del reactor hay una ligera pérdida, pero luego la W_f se incrementa. Esto quiere decir que el soporte aparentemente absorbe agua del medio y la humedad final es mayor así como el volumen líquido dentro del reactor. El balance (fig. 10.16) permite ver que el incremento de V_{lf} fue del 5 %. La interpretación al respecto es que la fibra no presenta una tendencia definida hacia el punto de equilibrio. Por lo que hay valores altos de W_i se manifiesta un gradiente axial de humedad, pero para valores bajos de W_i (aprox. 70 %) se manifiesta el efecto contrario la absorción de agua del medio.

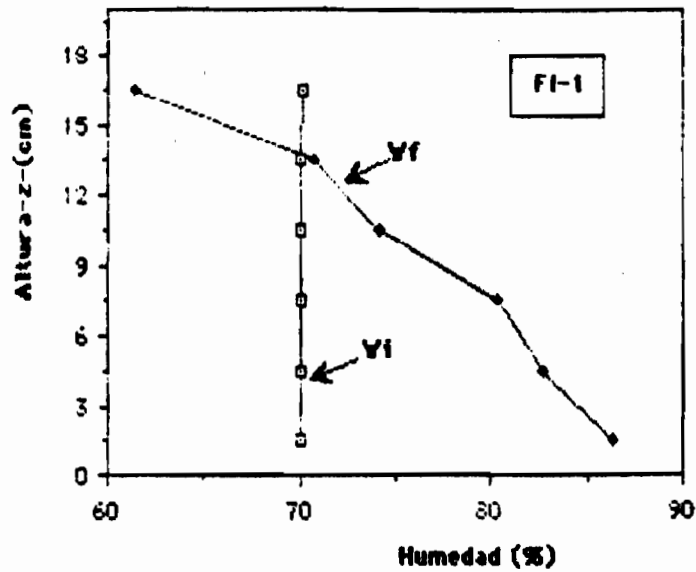


Fig. 10.15 perfiles axiales de humedad final (W_f) obtenidos con una humedad inicial (W_i) del 70 % para la (FI-1).

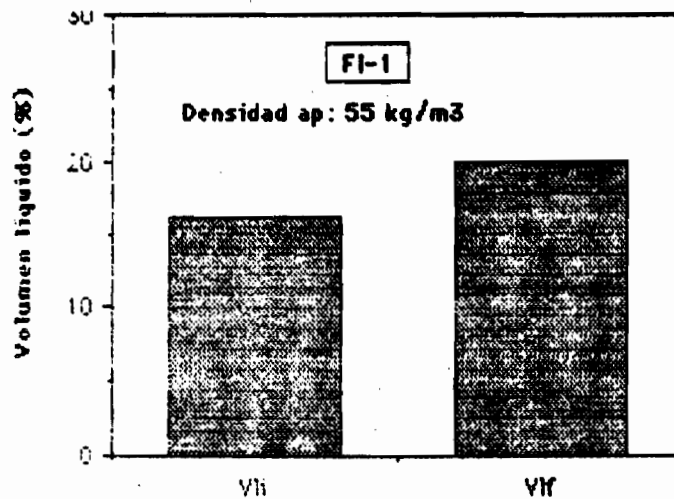


Fig. 10.16 Balance entre los volúmenes de líquido inicial (V_{li}) y volumen líquido final (V_{lf}), para la Fibra 1 (FI-1).

4. CASO DE LA ESPONJA (ES-1).

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE SATURACION.

En el caso de la ES-1 (fig. 10.17) se muestran dos resultados para una W_i del 93.9 %, la cual corresponde a la humedad de saturación. Se ve que los gradientes son muy similares para las dos muestras dicho gradiente es pequeño. Analizando los porcentajes (fig. 10.18) tenemos una pérdida del 20 % en V_l con respecto al inicial. Esto genera que el resultado del balance sea negativo.

Graficando los volúmenes ocupados dentro del reactor (fig. 10.19) tenemos que el volumen líquido inicial es de 64 % mientras que el volumen líquido final es del 40 % y el volumen sólido es de tan solo un 5 %. El balance entre el volumen de agua inicial y final presenta una pérdida del 30 % como consecuencia del escurrimiento dentro del reactor (fig. 10.19).

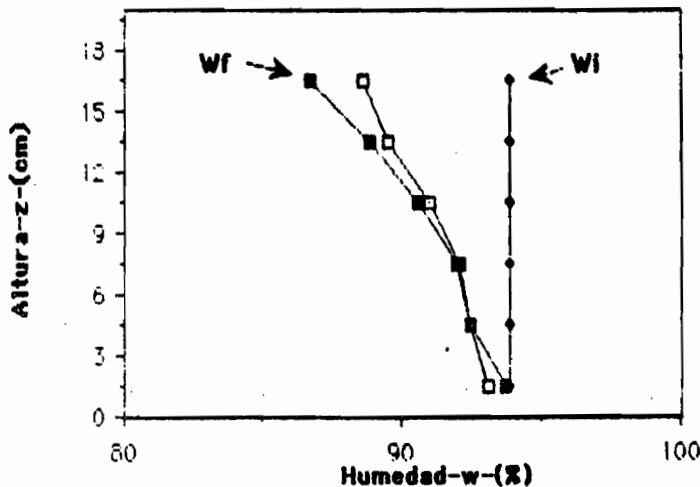


fig 10.17 Perfiles axiales de humedad para la ES-1 donde W_i representa a la humedad inicial y W_f la humedad final.

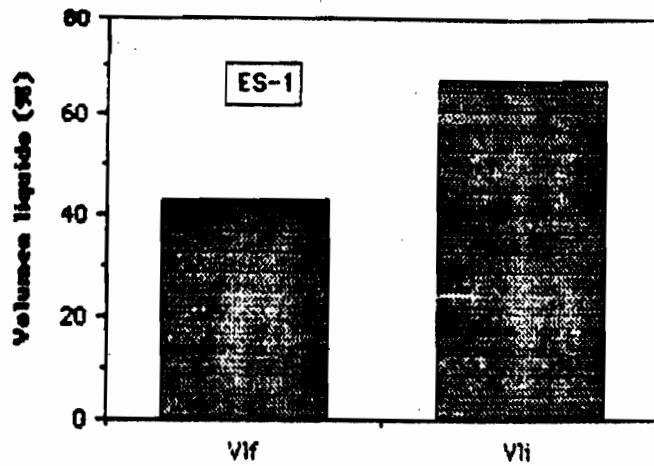


Fig. 10.18 Balance entre los volúmenes de líquido inicial (Vli) y final (Vlf) en el caso de la (ES-1).

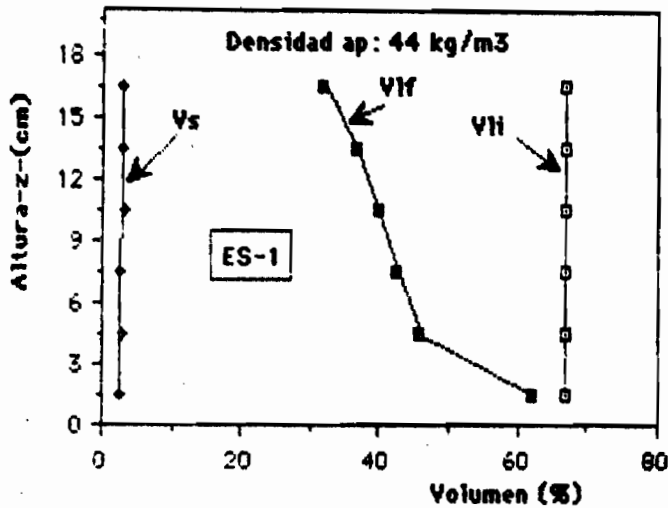


Fig. 10.19 Perfiles axiales de los volúmenes de líquido inicial (Vli), final (Vlf) y de sólido (Vs) para la (ES-1).

* ESTUDIO DE LA HUMEDAD DE EQUILIBRIO.

Tenemos ahora una W_i del 70 % (fig. 10.20). Observamos que estamos cerca del punto de equilibrio (sin efectos de drenaje). Esto se observa mejor en la (fig. 10.21) en la cual observamos que el volumen sólido es del 2.8 % y el del líquido es del 9 % aproximadamente. La (fig 10.22) nos muestra un balance equilibrado, por lo que se puede concluir que el punto de equilibrio esta cerca del 70 % de humedad.

En el caso de la esponja hemos tratado de empacar más al soporte sólido dentro del reactor. De esta manera hemos logrado un 36 % de ocupación de volumen de la fase líquida y un mayor volumen de ocupación de la fase sólida. Sin embargo el riesgo de empacar es el de generar nosotros mismos un escurrimiento lo que afectaría la humedad del sistema teniendo problemas de homogeneidad lo cual no es conveniente por el objetivo de este trabajo.

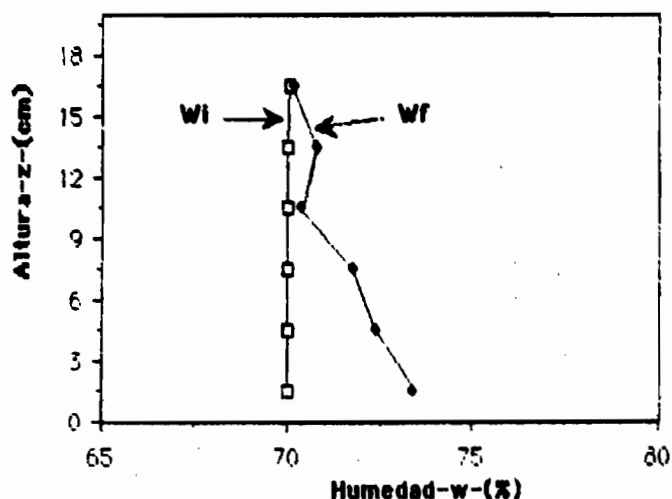


Fig. 10.20 Perfiles axiales de humedad para la ES-1 donde W_i representa la humedad inicial y W_f la humedad final.

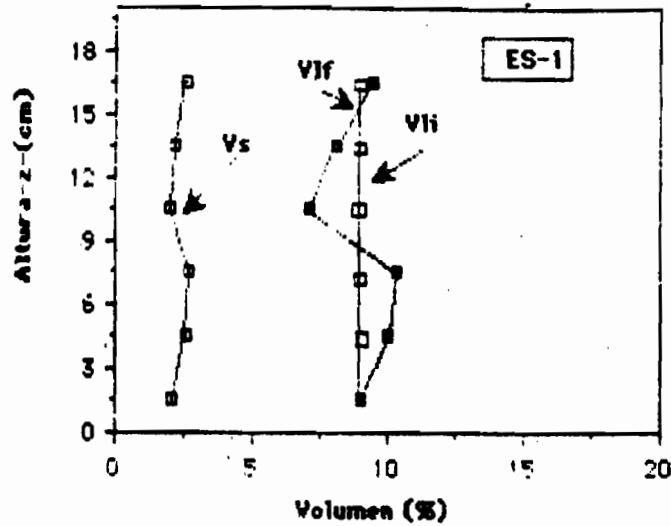


Fig. 10.21 Perfiles axiales de los volúmenes líquidos inicial y final (Vli y Vlf respectivamente) así como del volumen sólido (Vs) para la ES-1.

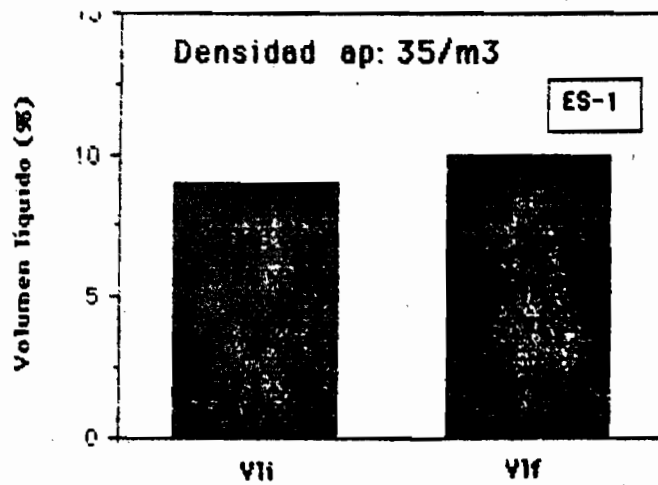


Fig. 10.22 Balance entre los volúmenes de líquido inicial (Vli) y volumen de líquido final (Vlf) para la ES-1.

5. CASO DE LA RESINA (AMBERLITA IRA-900).

A nivel de la amberlita presentamos la (fig. 10.23). La amberlita llega con una cierta humedad, pero sabemos que la máxima capacidad de absorción de esta resina es del 59 %. Por lo cual en esta parte del experimento solo verificamos si este valor de humedad es la humedad de equilibrio. Mediante la figura 10.23 podemos apreciar que no existen gradientes dentro del reactor, además que se puede constatar que efectivamente la humedad de equilibrio si esta en el rango del 59 %.

En la (fig. 10.24) se presentan los volúmenes de la fase líquida inicial, final y de la fase sólida. Constatamos que la fase sólida ocupa un 39 % y la fase líquida al equilibrio un 39 % y deducimos que la fase gaseosa ocupa un volumen del 36 %.

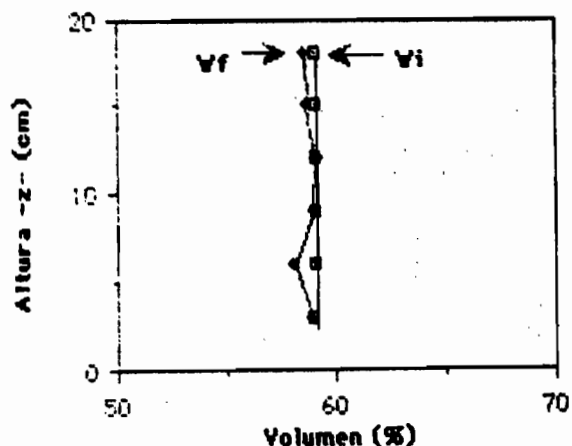


Fig. 10.23 Perfiles axiales de humedad final (W_f) obtenidos con una humedad inicial (W_i) del 59 % para la amberlita IRA-900.

6 SINTESIS DE LOS EXPERIMENTOS DE DRENAJE.

Se han visto principalmente dos tipos de comportamiento:

El primero es el de los poliuretanos que presentan un gradiente de humedad relativamente grande y como consecuencia una pérdida de agua. El otro es a nivel la fibra y la esponja que cuando nos encontramos por encima del punto de equilibrio hay gradientes de humedad los cuales no son muy severos, pero si estamos por debajo de este valor hay un fenómeno de absorción que permite que el balance tenga un mayor Volumen líquido final que Volumen líquido inicial lo cual no es muy conveniente. Finalmente el de la amberlita que no presenta gradientes de humedad para un alto contenido de agua. Mediante el análisis de resultados podemos establecer cuales son los diferentes volúmenes de ocupación para las diferentes fases (sólida, líquida y gaseosa) en la columna. La (fig. 10.24) muestra, para cada soporte (poliuretano, esponja, bagazo, yuca y amberlita), los diferentes valores en porcentaje para las diferentes fases. En el caso del poliuretano tenemos una ocupación de agua ($V_l=5.5\%$), muy bajo y un porcentaje de la fase gaseosa alto (92.4%). En el caso de la esponja se nota un aumento sustancial de la ocupación por la fase líquida ($V_l=36\%$) con compactación y sólida del (9.6%) con una reducción notable de la fase gaseosa ($V_a=54.5\%$). Estos valores pueden ser comparados a los reportados para bagazo ($V_l=24.5\%$, $V_a=68.5\%$, $V_s=7\%$). Para la amberlita y la yuca tenemos valores similares, lo cual es interesante ya que se pueden correlacionar algunos parámetros facilitando así la comparación entre un soporte orgánico y un soporte inerte, tal es el caso de la amberlita IRA-900.

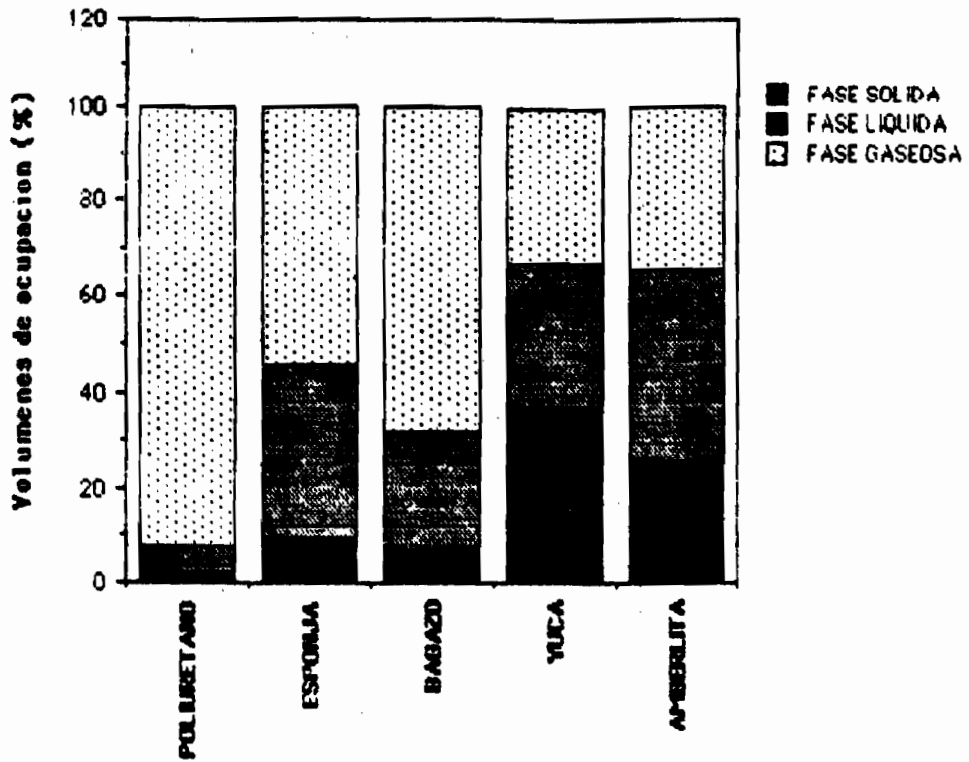


Fig. 10.24 Representación de los volúmenes de ocupación de sólido, líquido y gas dentro del reactor para los diferentes soportes.

D. CONCLUSION DE LA PARTE II.

En esta parte del trabajo se utilizaron varios soportes: Poliuretano de alta y baja densidad, esponja y fibra de celulosa y una resina (amberlita IRA-900). Estos fueron comparados con Yuca y Bagazo, los cuales se escogieron como soportes de referencia. Los resultados obtenidos en el estudio de inhibidores así como en los aspectos de drenaje y la comparación de algunos parámetros fisicoquímicos reportados en la literatura para algunos de los soportes permitió seleccionar un soporte modelo (teóricamente y bajo nuestros puntos de selección). A continuación se presenta una tabla (10.25) que muestra las ventajas y desventajas de los diferentes soportes utilizados para la selección. El soporte seleccionado fue la resina (amberlita IRA-900), esta resina es un material bien definido tanto a nivel físico: Debido a que posee una forma esférica, tamaño de partícula bien definido, porosidad y densidad conocidas. Como a nivel químico: rango de pH, fórmula estructural así como su selectividad iónica.

Se considera que la amberlita no presenta sustancias inhibitoras sobre el crecimiento de Asp. niger cepa 10. además permite mantener sin escurrimiento un alto porcentaje de agua dentro de su estructura porosa sin necesitar compactación; su porosidad interpartícula en cada experimento es idéntica.

SOPORTE	INHIBIDORES	U1 %	Us %	Ua %	HOMOGENEIDAD	FORMA	DATOS DISP.
PO-1 y 2	NO	5.5	2.1	92.4	REGULAR	IRREGULAR	POCOS
ES-1	SI	36*	9.6*	54.5**	REGULAR	IRREGULAR	MINIMOS
FI-1	SI	≈ 25	5	70	REGULAR	IRREGULAR	MINIMOS
AMBERLITA	NO	39	25	36	BUENA	ESFERICA	MUCHOS
BAGAZO	NO	24.5	7	68.5	REGULAR	IRREGULAR	MINIMOS
YUCA	NO	29	37	31*	MALA	IRREGULAR	MINIMOS

TABLA 10.25 VENTAJAS Y DESVENTAJAS, UTILIZADOS COMO CRITERIOS DE SELECCION.

U1 = Volumen liquido.

Us = Volumen solido.

Ua = Volumen gaseoso.

* Valores obtenidos con compactacion.

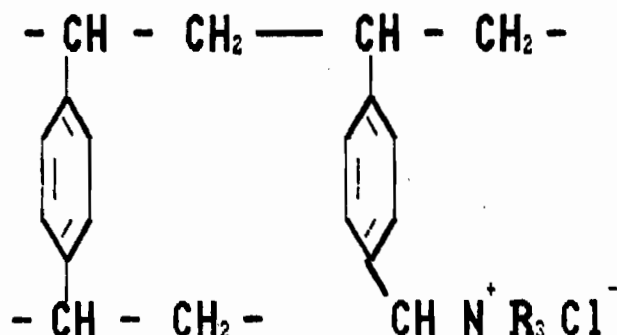
PARTE III

**CARACTERIZACION DEL CRECIMIENTO
DE Aspergillus niger SOBRE
AMBERLITA IRA-900.**

A. DESCRIPCION DE LA AMBERLITA.

La Amberlita IRA-900: Es una resina de intercambio iónico, producto de la tecnología química moderna. Esta resina es una partícula esférica de 0.53 mm de diámetro promedio. Estas pequeñas partículas están compuestas con grupos iónicos fijos como parte de la estructura de la resina, más grupos móviles de carga opuesta que son libres y vagan através o por todos los intersticios de la resina.

La resina escogida para este trabajo es la Amberlita IRA-900 (Cl) que es una resina fuertemente básica y cuya estructura es la siguiente:



Además posee las siguientes características o propiedades:

Forma:	Esférica.
Densidad real:	1.07 g/cm ³ .
Densidad aparente (59 % humedad)	0.672 g/cm ³ .
Tamaño:	0.53 mm de diámetro.
Rango de diámetro (soporte humedo)	16 a 50 mesh.
Rango de diámetro de los poros	2.5 a 23 micras.
Humedad de retención	59 %.
Rango de pH:	0-14.
Temp. max. de operación:	170 °C (Cl) y 140 °C (OH).
Capacidad total de intercambio: Kg CaCO ₃ /ft.	meq/ml.

Se puede regenerar con NaCl o con HCl.

Se utiliza para la desionización por su estabilidad.

B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA DE LA AMBERLITA.

S 11 JUSTIFICACION.

En la fermentación sólida es sabido que el nivel de humedad es importante para que el microorganismo pueda crecer. La actividad del agua (Aw) es un parámetro importante, el cual nos da una idea de la disponibilidad de agua en el soporte. Sabemos que por debajo de una cierta actividad de agua el microorganismo no se desarrolla, por lo que en este caso el agua es limitante ya que no se encuentra disponible para el hongo.

S 12 DEFINICION DE LA ACTIVIDAD DE AGUA.

A temperatura ambiente, el equilibrio termodinámico entre el agua dentro de un medio húmedo y el vapor, se produce mediante una relación entre la humedad del medio y la humedad relativa (HR) del aire, la cual es igual a la actividad de agua (Aw). Esto se puede escribir como:

$$HR = Aw = \frac{P_v (T)}{P_{vs} (T)}$$

$P_v (T)$ = Presión parcial de equilibrio del vapor con el agua del medio a una temperatura T.

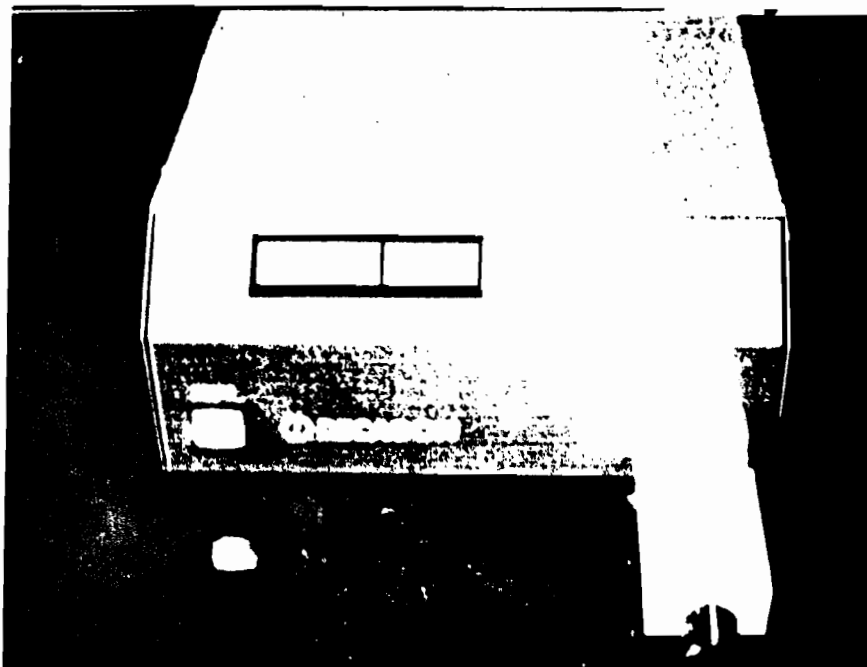
$P_{vs} (T)$ = Presión de vapor de saturación a una cierta temperatura T.

Esta ecuación es llamada isoterma de desorción, cuando el camino termodinámico escogido para establecer esta relación se hace con la humedad decreciente. Se llama isoterma de desorción.

S 13 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL - MODO DE OPERACION.

1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.

En la fotografia 13.1 se puede observar el dispositivo experimental usado para medir la actividad del agua del soporte. La muestra se deposita en una cajita de plástico la cual se coloca en el CX-1 (DECAGON). Un pequeño ventilador permite la circulación del aire sobre la superficie de la muestra; acelerando el equilibrio del vapor. Un sensor infrarrojo mide la temperatura de la superficie de la muestra, eliminando la necesidad de esperar el equilibrio térmico. Un espejo interno enfria hasta llegar a la condensación del vapor de agua a la temperatura del punto de rocío. Un sistema de cómputo interno mediante las temperaturas de superficie y el punto de rocío calcula la actividad de agua (Aw). Este sistema permite una lectura de Aw en un tiempo no mayor a los 5 minutos.



Fotografía 13.1: Dispositivo para medir la actividad de agua del soporte. (CX-1 DECAGON)

2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA.

Las medidas se realizaron cada 30 minutos sobre la misma muestra. Para efectuarlas se coloca la muestra en las cajitas del CX-1 (DECAGON) y se introduce en él. Se acciona el mecanismo y el sensor determina directamente el Aw y la temperatura de superficie. Esta medida se efectúa en un tiempo no mayor de 5 minutos.

3. MODO DE OPERACION.

* ISOTERMAS DE DESORCION.

Se toman 2 gramos de soporte (AMBERLITA) seco y se le agregan 2.88 ml de agua destilada para tener una humedad del 59 % en base húmeda. Se mezcla y se toma una parte la cual se coloca dentro de unas cajitas de plástico especiales del DECAGON, evitando que la muestra rebase la mitad del nivel de la caja. Se registra el peso de la muestra y se introduce en el DECAGON, se toma la lectura correspondiente de Aw y Temperatura. Se saca la caja y para secar se introduce en una incubadora a 30 °C aproximadamente 5 min. Se registra nuevamente el peso y se efectúa la medida correspondiente. Esta metodología se repite hasta que la Aw se vuelve constante.

* ISOTERMAS DE ADSORCION.

En el caso de las isotermas de adsorción se coloca una muestra de un gramo seco sobre un baño María para que el soporte absorba la humedad del medio. Se registran los pesos húmedos para conocer la humedad correspondiente. Para medir la Aw procedemos de la misma manera que en el caso de las isotermas de desorción, hasta llegar a una muestra que no puede adsorber más agua y la lectura del sensor sea constante.

S 14 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.

1.- COMPARACION DE LAS ISOTERMAS DE ABSORCION Y DESORCION.

Representamos en la (fig.14.1) las isotermas de desorción y adsorción de la amberlita IRA-900. En el caso de la desorción constatamos que el límite higroscópico se manifiesta más o menos en un 20. % de humedad base húmeda y un 40 % base seca.

Este valor corresponde a un 0.9 Aw. Podemos observar que existe una fuerte histéresis, la curva de adsorción está lejos de la curva de desorción a 30°C. En el caso de la adsorción no se puede ir más lejos de un Aw de 0.9 para superar este valor se necesitaría mucho más tiempo para que la resina absorbiera el vapor de agua necesario para incrementar el valor de Aw.

2.- COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA DE LA AMBERLITA, YUCA Y BAGAZO.

Para poder evaluar la disponibilidad del agua para el hongo se estudió la actividad del agua Aw en el soporte. La (fig 14.2) muestra comparativamente la Aw del bagazo, la yuca (datos reportados por Oriol et al (1988)) y la amberlita en un rango reportado como importante para el desarrollo de la fermentación ($0.8 < A w < 1$). En esta figura hemos relacionado la Aw de los tres soportes en función del inverso de la humedad (base seca). Notamos que existe un factor de 5 entre las pendientes de la yuca y el bagazo con respecto a la amberlita. Podemos decir que para un mismo valor de Aw tenemos mayor cantidad de agua en la amberlita que la que se encuentra en el bagazo y yuca. Comparando el valor de las pendientes (fig. 14.2) podemos ver que el agua está menos disponible en la amberlita que en el caso de los soportes agrícolas (yuca y bagazo).

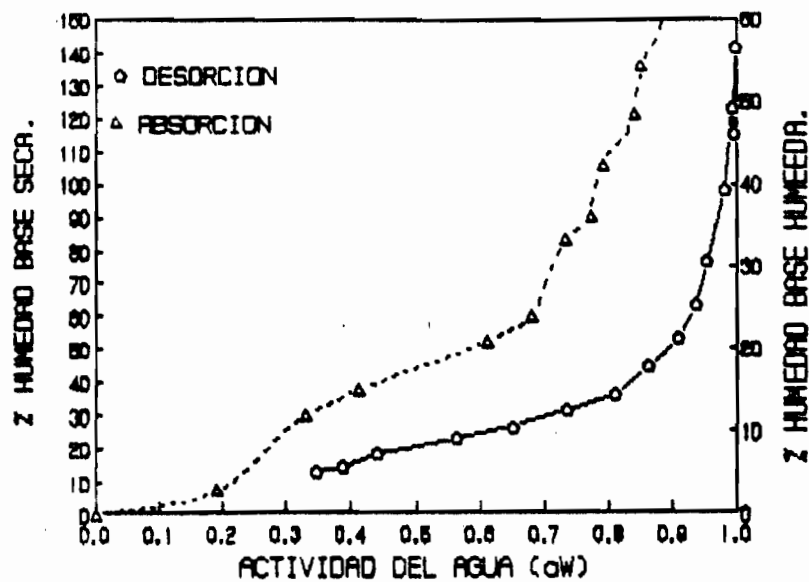


Fig. 14.1 COMPARACION DE ISOTERMAS PARA LA AMBERLITA.

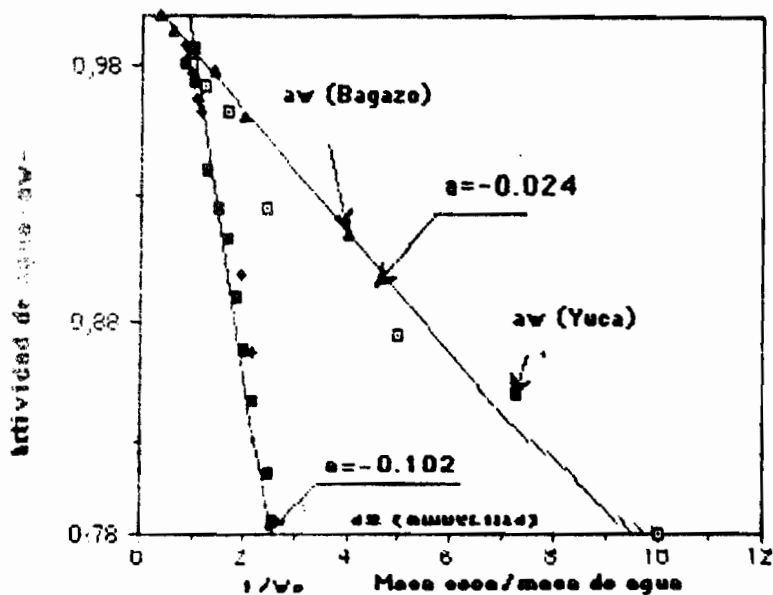


Fig. 14.2 Comparación de a_w entre la yuca, bagazo y amberlita. Los datos de Yuca y Bagazo son los reportados por Oriol (1988).

C ESTUDIO DE LA DESHIDRATACION DE LA AMBERLITA.

S 15 JUSTIFICACION.

Sabemos que la amberlita retiene un 59 % de la humedad (base húmeda) sin presentar fenómenos de drenaje, pero esta capacidad de retención bajo otras circunstancias es importante. En nuestro caso si la resina no presenta drenaje, pero tiende a secarse rápidamente puede implicar problemas para el crecimiento de Asp. niger ya que el hongo para crecer necesita de la disponibilidad del agua en la cual se encuentran disueltos los nutrientes (en este caso debido a que trabajamos con un soporte impregnado con medio de cultivo). Por lo tanto esta parte del estudio resulta necesaria para poder tomar desiciones posteriores.

S 16 PRINCIPIO DEL EXPERIMENTO.

En este experimento se trata de evaluar la resistencia que ofrece el soporte a la deshidratación, mediante una sal saturada de agua que impone una cierta humedad relativa al sistema. K_2SO_4 (HR)= 96 %, KNO_3 (HR)= 89 %, estas sales ejercerán un efecto de deshidratación sobre el soporte debido a que la actividad de agua de la resina es superior al 0.98 %.

Este experimento se realizó a una temperatura de 35°C y hasta que el soporte llegó al equilibrio.

S 17 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION.

1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.

En el desarrollo del experimento se utilizó una cámara, de la cual en la parte superior se suspendía una base en donde se deposita el soporte con un a humedad del 59 % (base húmeda) y en el fondo se tiene una solución de K_2SO_4 , la cual impone una humedad relativa del 96 %. La cámara fue cerrada herméticamente e introducida dentro de un baño a 35 °C, el monitoreo se realiza cada 24 horas hasta llegar al punto de equilibrio en donde se cambio la sal (KNO_3) la cual impone una humedad relativa del 89 % y se procedio de la misma manera que con la primera sal. La (fig. 17.1) muestra el dispositivo experimental usado.

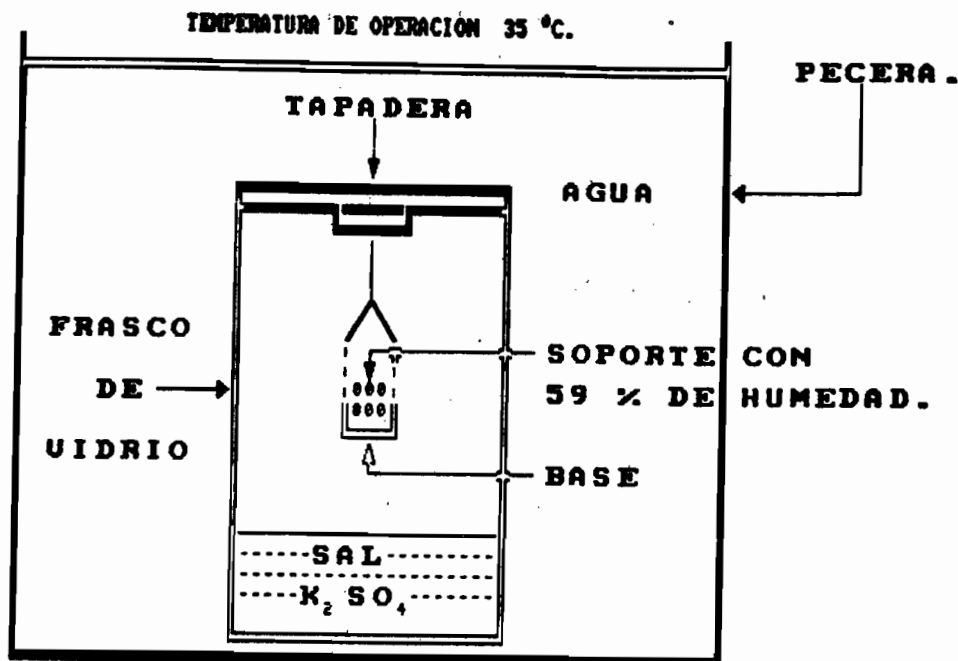


FIG. 17.1 SISTEMA EXPERIMENTAL PARA LA DESHIDRATACION DE LA AMBERLITA IRA-900.

2.- MODO DE OPERACION.

Para poder observar el efecto de la deshidratación del soporte en función del tiempo se tomó el peso húmedo inicial y se registro la perdida de peso cada 24 horas hasta llegar al punto de equilibrio. Este procedimiento se realizó para dos sales K_2SO_4 y KNO_3 .

5 18 ANALISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES.

En la (fig. 18.1) se encuentra representado el cambio de la humedad (base húmeda) contra el tiempo y podemos ver que se necesitan 13 días para deshidratar en un 50 % al soporte. Esto es importante ya que el soporte presenta una resistencia a la deshidratación. El punto más importante es que en 2 días el soporte solo pierde un 3.5 % lo cual realmente no es considerable si tomamos en cuenta que los experimentos que vamos a realizar duran aproximadamente 30 horas y que además se hace pasar una corriente de aire saturado de humedad. Debido a esto creemos que el soporte no presenta problemas de deshidratación que pudiesen repercutir en la disponibilidad de agua para el hongo. Podemos decir en conclusión que el tiempo de respuesta al mecanismo de deshidratación no es comparable al tiempo de fermentación.

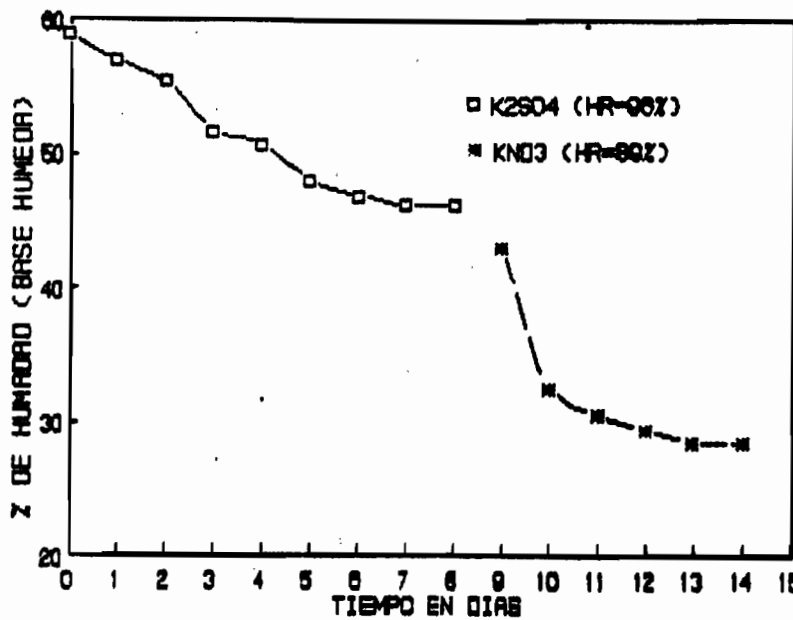


Fig. 18.1 EFECTO DE LA HUMEDAD RELATIVA DEL MEDIO SOBRE LA AMBERLITA.

D. SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO.

S 19 JUSTIFICACION.

Los requerimientos nutricionales de los microorganismos son un factor importante para que este crezca adecuadamente. En el caso de *Asp. niger* se han utilizado diversos medios de cultivo, pero el desarrollo y aprovechamiento varió. Por lo que en este estudio nos hemos basado en el medio Crapeck modificado con el cual se han obtenido buenos resultados manteniendo la relación C/N constante y variando la relación de nitrógeno orgánico e inorgánico para ver la influencia de este macroelemento sobre el crecimiento del microorganismo en cuestión.

S 20 FUNDAMENTO DEL EXPERIMENTO.

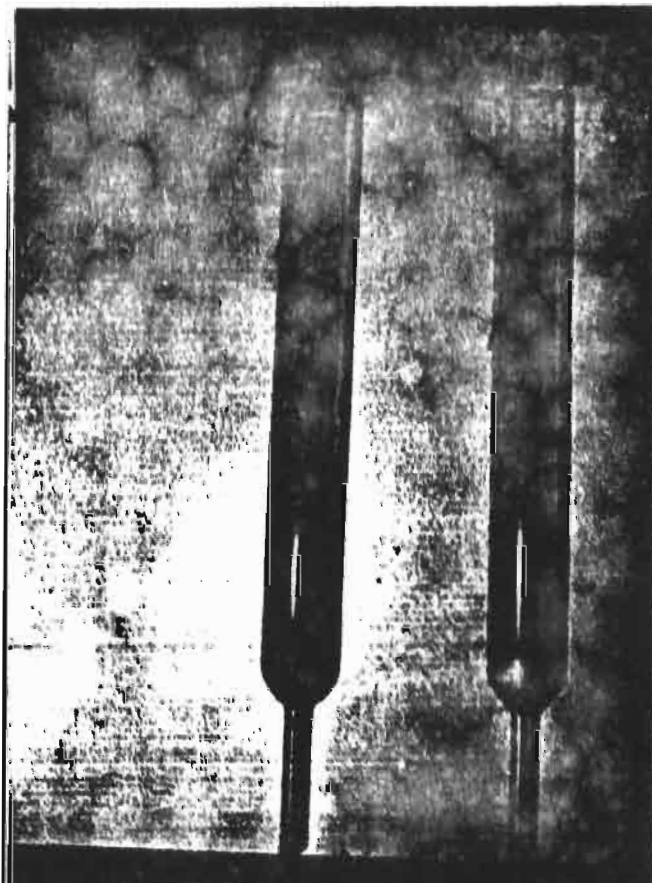
El experimento se basa en las necesidades nutricionales del microorganismo para poder desarrollarse adecuadamente en función de la composición del medio de cultivo.

S 21 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION.

1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.

El crecimiento de Asp. niger cepa 10 se realizó en columnas de vidrio descritas por Rimbault et al (1980). En la fotografía 21.1 se observan las columnas recién empacadas con el soporte la altura de lecho empacado es de 12 cm aproximadamente. Para los diferentes experimentos realizados la altura del lecho fue de 7 cm. Las columnas fueron colocadas en un baño de agua de temperatura controlada a 35°C y con un flujo de aire de 2 l/h. Este aire fue suministrado mediante una bomba, que manda el aire a un presaturador y después a un humidificador en la parte inferior de la columna (fig. 21.1).

Fotografía 21.1 Columnas empacadas con el soporte modelo (Amberlita IRA-900)



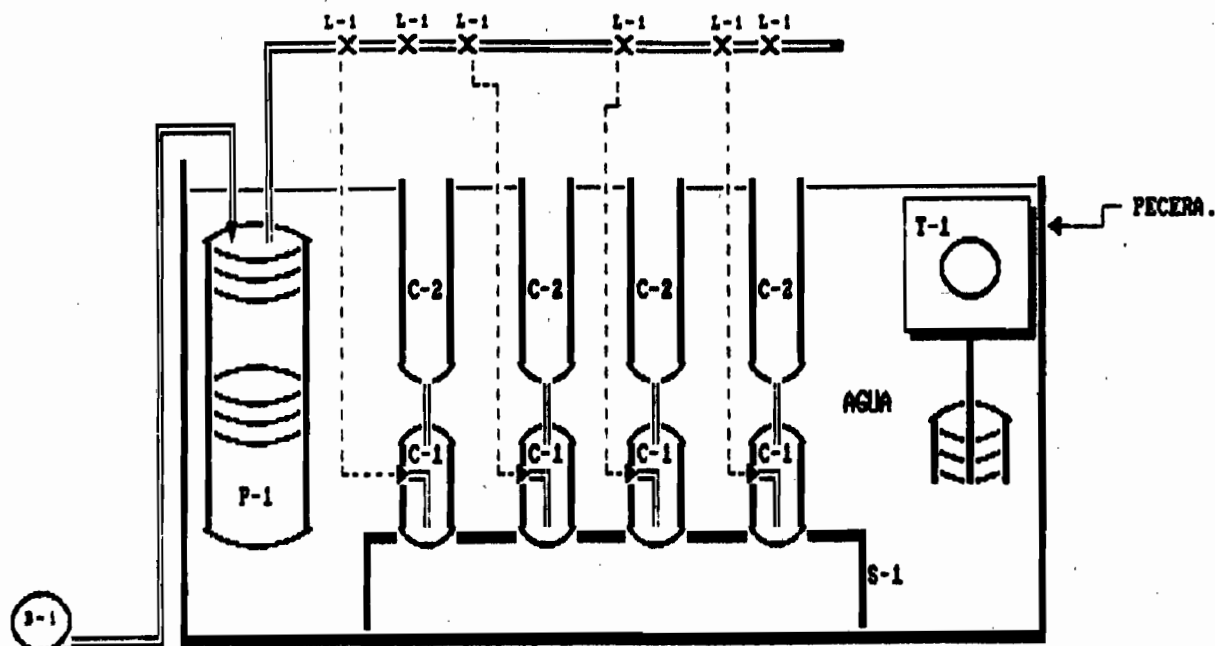


FIG. 21.1 SISTEMA EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA EL CRECIMIENTO DE Aspergillus niger.

DONDE:

B-1 BOMBA
H-1 HUMIDIFICADOR
C-2 COLUMNAS DE VIDRIO
S-1 SOPORTE DE ACRILICO.

P-1 PRESATURADOR
C-1 FUNELES DE VIDRIO
T-1 REGULADOR DE TEMPERATURA

2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS, AZUCARES Y eH.

* PROTEINAS

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método colorimétrico de Lowry (1951). Para esto se toma un gramo de soporte húmedo después de la fermentación, el cual se coloca en un vaso de precipitados de plástico. Esta muestra se suspende con 50 ml de agua destilada y se separa mecánicamente mediante el ultraturrax a 8000 rpm aproximadamente durante 1 minuto. Teniendo cuidado de no fragmentar la amberlita, con esta operación la biomasa es separada del soporte. La biomasa queda en el sobrenadante el cual es separado con una pipeta automática. Esta operación se repite hasta tener libre de soporte a la biomasa, teniendo únicamente biomasa en el vaso. Se homogeniza nuevamente en el ultraturrax aumentando el tiempo de exposición así como la velocidad 10000 rpm. De esta mezcla se toma 1 ml en un tubo de ensaye y se le agrega 1 ml de NaOH 1 N.

Se tapa y se coloca en un baño a temperatura de ebullición durante 5 min, para detener la reacción inmediatamente se deberá de poner en baño de hielo. Una vez fría la muestra se le agregan 5 ml de una solución que está compuesta por:

- 50 ml de solución A: 20 g de carbonato de sodio en 1000 ml de NaOH 0.1 N.
- 1 ml de solución B: 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua destilada.
- 1 ml de solución C: 1 g de sulfato de cobre en 100 ml de agua destilada. Se agita en el vortex y se deja reposar en la obscuridad 30 minutos, posteriormente se agrega 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua destilada. Se agita en el vortex y se deja reposar en la obscuridad 30 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 750 nm, comparando contra un estándar utilizando filtro rojo. Las medidas son realizadas por duplicado en cada experimento.

Con los datos de la curva estándar de absorbancia y concentración, se realizó una regresión lineal obteniendo la siguiente ecuación reordenada:

$$X = \frac{Y + 0.016883}{0.006045} \dots\dots\dots(1)$$

Donde:

- X = Concentración de proteína en mg/l.
- Y = Densidad óptica que se obtenga del problema.
- Coefficiente de correlación de: 0.99

* AZÚCARES

Los azúcares residuales fueron medidos mediante el método Fenol-sulfúrico (modificado). Una vez separada la biomasa del soporte el sobrenadante se filtra y se efectúa una dilución 1:2 y 1:1 según el tiempo de fermentación. Luego se toman 2 ml de muestra y se le agregan 4 ml de reactivo Fenol-Sulfúrico previamente preparado (50 mg de fenol en 50 ml de H₂SO₄). Al agregar el reactivo se deberá hacer lentamente ya que la reacción es exotérmica, se agita en el vortex y se deja enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se lee inmediatamente la absorbancia a 480 nm. Con los datos de absorbancia contra concentración se realizó una regresión lineal obteniendo la siguiente ecuación reordenada:

$$Y1 = 680.3176 * X1 + 32.2 \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

Y1 = Concentración de azúcar en mg/l.

X1 = Densidad óptica del problema.

Coefficiente de correlación: 0.9948

para utilizar la ecuación vease la nota.

* pH

El pH es medido de la siguiente manera. Se toman 2.5 g de muestra y se le agregan 25 ml de agua destilada, se agita con un caframo durante 5 minutos y se determina el pH mediante un potenciómetro electrónico.

NOTA: Para hacer uso de la ecuación (2) y (3) cada que se efectúe la lectura de una muestra problema deberá de leerse una muestra de concentración conocida (de la curva patrón) para así conocer el factor de error con que se trabajó y corregir los datos experimentales.

3. MODO DE OPERACION

* COMPOSICION DE LOS MEDIOS UTILIZADOS

Los medios de cultivo para este experimento son básicamente iguales. Lo que difiere es la relación de nitrógeno orgánico e inorgánico como se puede apreciar en la siguiente tabla.

RELACION C/N = 12.

COMPONENTES	I	II	III	IV	V
RELACION DE NITROGENO ORGANICO E INORGANICO	0:100	25:75	50:50	75:25	100:0
SACAROSA	65	65	65	65	65
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.74	8.06	5.37	2.68	0
UREA	0	1.22	2.44	3.66	4.88
K ₂ HPO ₄	2	2	2	2	2
MgSO ₄	1	1	1	1	1
KCl	1	1	1	1	1
FeSO ₄	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

Tabla 21.3.1: Composición de los diferentes medios utilizados en el proceso de selección. Las concentraciones están dadas en g/l.

* CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para estos experimentos las condiciones experimentales son:

- Humedad inicial del soporte: 58 %
- Flujo de aire: 2 l/h
- Temperatura de operación: 35°C
- Cantidad de soporte utilizado por columna: 5 g (secos)
- Cantidad de inóculo: 1 E8 esporas/g s. seco
- pH del medio de cultivo: 2.7
- pH de la amberlita: 5.5

* METODOLOGIA

TRATAMIENTO DEL SOPORTE.

La amberlita IRA-900 tiene una cierta humedad cuando llega al laboratorio. Entonces lo primero que se hace es secar la amberlita a 70°C durante 48 horas y ajustar el pH a 5.5 con HCl 1 N, para esto por cada gramo de amberlita seca se le agregan 4 ml de agua destilada, se agita y se agrega HCl 1 N hasta un pH de 5.5 (lectura del potenciómetro). Una vez terminado este paso se elimina la mayor cantidad de sobrenadante y se enjuaga el soporte, para lo cual se agregan 2 ml buffer de fosfatos pH 5.5, por cada gramo de soporte una vez enjuagado se decanta para eliminar la mayor cantidad de sobrenadante y se procede a secar durante 48 horas a 70°C.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Se prepara el medio de cultivo (tabla 21.3.1) y se ajusta el pH a 2.7 con HCl 1 N y a 30 ml de medio se le adicionan 2 gotas de tween 80 y se esteriliza por separado durante 15 min a 15 lb de presión. Una vez estéril el medio con tween se utiliza para la suspensión de esporas, el conteo se efectúa en cámara de Newbauer, se calcula el volumen en que se tendrán 5 E8 esporas y el volumen necesario para tener el 58 % de humedad se logra agregando medio de cultivo.

PREPARACION DE LA MEZCLA: SOPORTE MEDIO DE CULTIVO.

Una vez agregado el volumen necesario se mezcla y se empaca en las columnas de vidrio, que en la parte superior llevan un tapón de algodón y en la parte inferior un humidificador a través del cual pasa el aire.

El tiempo de operación escogido fue de 30 horas pasado este tiempo se cuantificará la biomasa, los azúcares residuales y el pH.

S 22 ANALISIS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

Si se considera la cantidad de proteína alcanzada al final de la fermentación (tabla 18.1); se puede destacar que la relación de nitrógeno orgánico e inorgánico (50:50) proporciona un mejor crecimiento del microorganismo (en nuestro caso). Además se puede observar que conforme aumenta la cantidad de nitrógeno orgánico también aumenta el pH final, esto se debe a que la Urea (fuente de nitrógeno orgánico) ejerce un efecto amortiguador en el proceso. Lo que es importante es que con la misma relación de nitrógeno (50:50), también se obtiene un pH muy cercano al reportado por Raimbault (1980) para el crecimiento de Asp. niger sobre Yuca.

Como ya se dijo el medio III, relación de nitrógeno orgánico e inorgánico (50:50), fué el que proporcionó un mayor crecimiento esto es una mayor cantidad de proteína. Lo anterior se corrobora con la cantidad de azúcares residuales cuantificados al final del experimento, ya que se encuentran en menor proporción que en los otros medios utilizados.

Por lo que respecta a la humedad final no se presentaron variaciones significativas ya que la variación es de un 2 a 3 % con respecto a la humedad inicial (59 %). Esto se debe a la resistencia que ofrece el soporte a la deshidratación.

Con todo esto podemos decir que el medio adecuado para nuestros objetivos es el medio III. Sin embargo estos experimentos son bastante someros, por lo que es necesario mejorar el crecimiento del microorganismo. Para lo cual se puede variar la concentración de azúcares, aumentar la relación C/N, así como el adicionar algunos microelementos y variar los volúmenes de inoculación.

MEDIO	RELACION DE NITROGENO (NH ₄) ₂ SO ₄ - UREA.	pH INICIAL	pH FINAL	PROTEINA mg/g s/s (*)	AZUCARES RESIDUALES mg/g s.s (*)	% HUMEDAD FINAL.
I	100 - 0	4.6	2.6	5.25	8.65	55.85
II	75 - 25	4.66	3.17	5.82	8.47	56.25
III	50 - 50	4.36	3.58	6.35	7.89	56.55
IV	25 - 75	4.26	4.12	5.88	8.38	56.92
V	0 - 100	4.39	4.58	5.26	8.88	57.38

TABLA 18.1 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE Aspergillus niger SOBRE AMBERLITA, VARIANDO LA CONCENTRACION DE NITROGENO PARA UN C/N = 12

(* mg de proteina por gramo de soporte seco)

5. CARACTERIZACION DEL CRECIMIENTO DE ASP. NIGER SOBRE AMBERLITA.

5.23 JUSTIFICACION

El crecimiento de Asp. niger a sido estudiado sobre algunos soportes orgánicos, pero se a observado que estos ejercen una influencia directa sobre el crecimiento del microorganismo. En nuestro caso es necesario generar información acerca del comportamiento del hongo durante su fase de crecimiento, para así determinar si el soporte en estudio realmente puede ser utilizado como un soporte modelo. De esta manera podemos saber si el soporte seleccionado presenta características similares en cuanto al crecimiento con respecto a los soportes utilizados en FES, como Bagazo y Yuca.

S 24 FUNDAMENTO DEL EXPERIMENTO

El desarrollo del experimento está basado en las condiciones óptimas de crecimiento del hongo ya conocidas como: requerimientos nutricionales, temperatura y pH. Con estos parámetros esperamos que el hongo pueda desarrollarse adecuadamente sobre el soporte. Mediante un muestreo periódico deseamos conocer la cinética de crecimiento, el consumo de sustrato, la variación del pH, la producción de CO₂ y el consumo de O₂, la disponibilidad de agua, la humedad, la caída de presión, la desviación del tamaño de las partículas y la variación del diámetro promedio de partícula. Con todos estos parámetros podremos comparar con otros estudios realizados anteriormente sobre soportes almidonados (Yuca) y sobre bagazo de caña.

S 25 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL-MODO DE OPERACION

1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Para este experimento se utilizaron columnas de vidrio descritas por Raimbault et al en 1980 (vease fotografía 17.1 y figura 17.1) dichas columnas estan colocadas dentro de un baño de temperatura controlada a 35 °C, las columnas en la parte inferior tienen un humidificador através del cual pasa el aire que es suministrado mediante una bomba de vacío el flujo de 2 l/h es regulado mediante llaves de paso (ver fig. 21.1).

2.- MODO DE OPERACION

* TRATAMIENTO DEL SOPORTE

El pH de la amberlita tiene que ser ajustado a 5.5 con HCl 1N. Para esto vease página No. 68 metodología (tratamiento del soporte).

* PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO E INOCULO

La composición del medio de cultivo es la siguiente:

Sacarosa	65.00 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.37 g/l
UREA	2.44 g/l
K ₂ PO ₄	2.00 g/l
MgSO ₄	1.00 g/l
KCl	1.00 g/l
FeSO ₄	0.02 g/l

Una vez preparado el medio de cultivo se ajusta el pH a 2.7 con HCl 1 N se toman 40 ml y se le agregan 2 gotas de tween 80 y se esteriliza durante 15 min a 15 lb de presión, se enfría y el medio con tween se emplea para el conteo de esporas así que se añade al matraz con esporas y se efectúa la suspensión se agitan mediante un agitador magnético y el conteo se hace mediante una cámara de Neuwahuer al microscopio. Se calcula cual es el volumen necesario para tener el número de esporas (1 E8 esporas/g s.seco.). El volumen de agua necesario para tener el 59 % de humedad en base húmeda se completará con el medio de cultivo estéril.

* CONDICIONES DE OPERACION

Humedad inicial 59 %
Inóculo 1 E8 esporas/g s. seco
pH inicial del medio de cultivo 2.7
pH inicial del soporte 5.5
Temperatura de operación 35 °C
Flujo de aire 2 l/h
Condiciones no estériles
Fuerza de empaque gravitatoria.

* DESAROLLO DEL EXPERIMENTO

Una vez teniendo el soporte y el medio de cultivo con el pH deseado y conociendo el volumen de esporas a utilizar se procede a pesar 5 g de soporte se le agrega el volumen de esporas que contenga 5 E8 esporas y se completa al 59 % de humedad con medio de cultivo, se mezcla perfectamente y se procede a empaçar las columnas, las cuales tienen en el fondo

un pedazo de algodón para evitar que el soporte caiga de la columna, una vez empacadas las columnas se coloca un tapón de algodón en la parte superior, las columnas son montadas sobre un saturador y este conectado al flujo de aire. Una vez armado el sistema se introduce en un baño a 35 °C para incubación posteriormente se van retirando las columnas en función del tiempo, para poder seguir así la cinética de crecimiento. Para poder seguir la cinética de consumo de O₂ y producción de CO₂, así como la caída de carga se tomó una columna y se conecto directamente a un cromatógrafo (Gow Mac) y para la caída de carga esta misma columna se conecto a un manómetro de agua. Los análisis que se efectúan para tal caso son:

- Proteína.
- Azúcares residuales.
- pH.
- Actividad del agua.
- Humedad.
- Caída de presión.
- Consumo de O₂ y producción de CO₂.
- Variación del diámetro promedio del espectro de partícula.

E. METODOLOGIAS EMPLEADAS.

- 1.- Proteína método de Lowry (vease capítulo 17 sección A)
- 2.- Azúcares residuales método Fenol-Sulfúrico (vease capítulo 17 sección B)
- 3.- pH (vease capítulo 17 sección C)
- 4.- Actividad del agua (vease capítulo 13 sección 2)
- 5.- Humedad (vease capítulo 9 sección 2)

6.- Caída de presión, para esta medida la columna utilizada tiene una salida en la parte inferior la cual esta conectada a un manómetro de agua (fig.25.7.1), por lo que mediante el desplazamiento del agua que se encuentra contenida dentro del manómetro, podemos conocer la caída de presión generada por el crecimiento del hongo en función del tiempo.

7.- Consumo de O₂ y producción de CO₂. Para efectuar estos análisis se utilizo una sola columna, la cual se conecto directamente al cromatógrafo de gases. Para conocer el porcentaje de O₂ y CO₂ consumido y producido respectivamente a través del tiempo, que correlacionado con el flujo de 2 l/h nos permite conocer el volumen de O₂ consumido por el hongo a través del tiempo de experimentación. La columna utilizada para estas determinaciones fue una columna doble tipo CTRI. la figura 25.7.1 muestra el dispositivo empleado para medir la caída de presión y el consumo de oxígeno.

8.- El diámetro del espectro de partícula fue medido al microscopio, para tal efecto se toma una muestra y se coloca sobre un portaobjetos, se coloca sobre el microscopio de contraste de fases y con el objetivo de 40 se realiza la medida del diámetro de partícula de 100 esferas. Cabe mencionar que uno de los lentes del microscopio posee una graduación de 0 a 90 o lo que es igual de 0 a 900 micras, el conteo tiene que ser rápido para evitar que la muestra se seque y que el tamaño de partícula se vea afectado. Finalmente se calcula el diámetro promedio mediante un análisis estadístico.

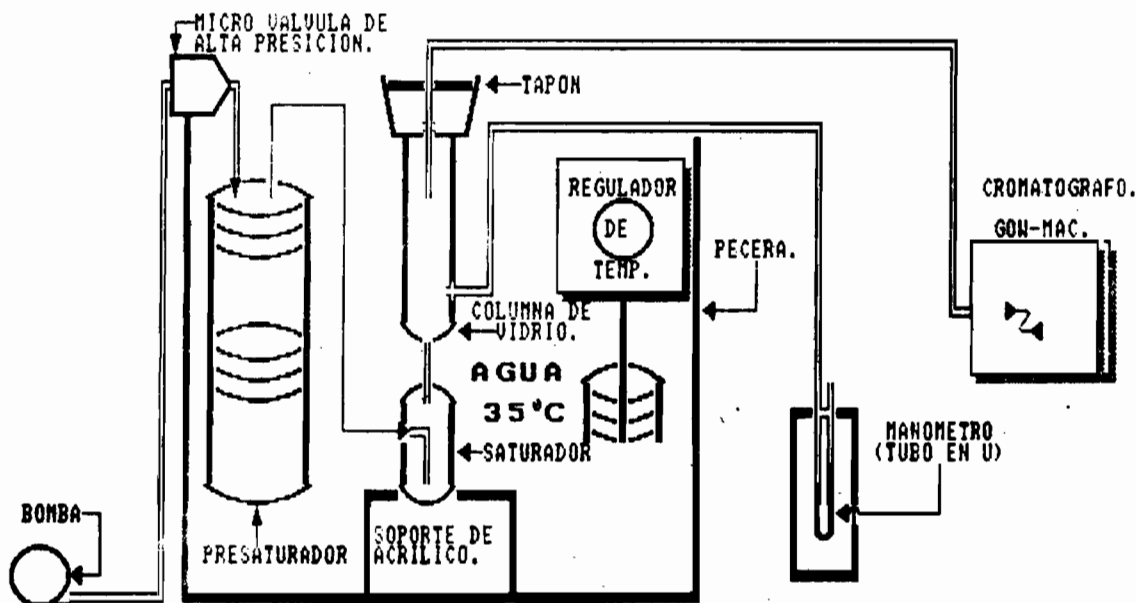


FIG. 25.7.1 SISTEMA EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA CUANTIFICAR CAIDA DE PRESION Y EL CONSUMO DE OXIGENO.

S 26 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

En la (fig. 26.1), están representadas las cinéticas de crecimiento (medida por proteínas (Lowry (1951), de consumo de azúcares (medida por el método de fenol-sulfúrico. (Montgomery (1961)) y caída de presión (cuantificada con un manómetro de agua. En la (fig. 26.2) están representadas las cinéticas de consumo de O₂ (OUR), producción de CO₂ (CDPR), así como el coeficiente respiratorio que es el cociente de producción de CO₂ entre el consumo de O₂ (QR).

En trabajos anteriores el tratar de seguir la cinética de crecimiento mediante la cuantificación de proteínas no había dado grandes resultados, ya que la presencia de ligninas produce interferencia en dicho método. En nuestro caso el soporte como no es orgánico no presenta ligninas, además la utilización de esta técnica ha sido posible por que la biomasa es separada del soporte casi completamente. Obteniendo un sobrenadante con la biomasa la cual se homogeneiza para poder tener una alicuota representativa y poder efectuar los análisis. Esto nos permitió hacer confiables y reproducibles nuestros resultados.

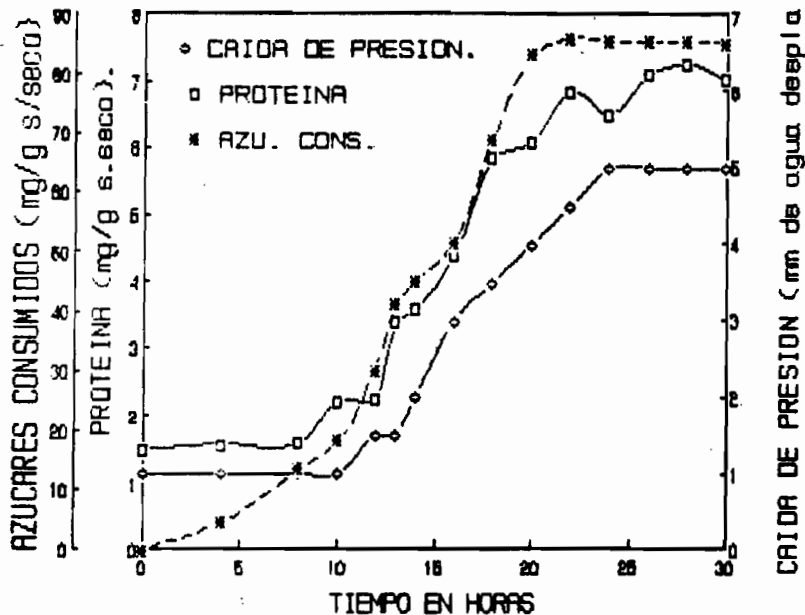


Fig. 26.1 Cinéticas de crecimiento (proteína), consumo de sustrato y caída de carga.

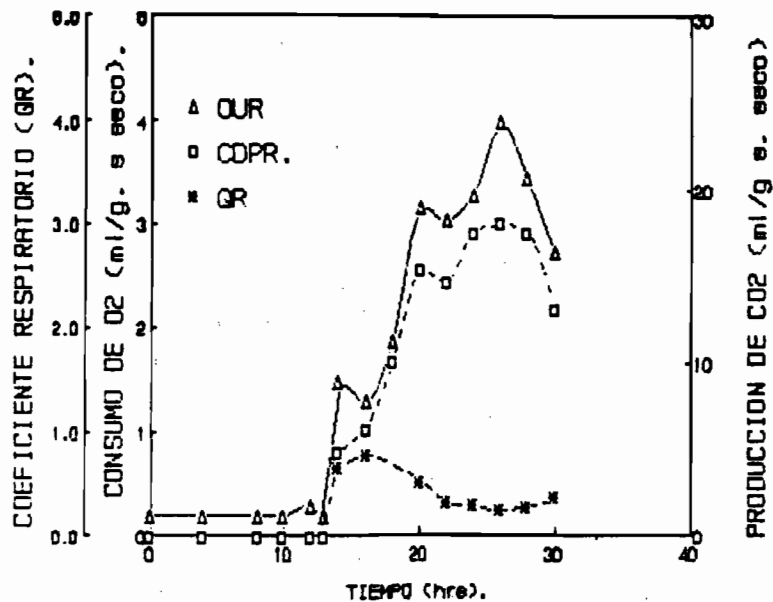


Fig. 26.2 Perfiles de O₂ consumido (OUR), CO₂ producido (CDPR) y Coeficiente respiratorio (QR).

Mediante los resultados obtenidos después de varios experimentos, hemos observado que el crecimiento de *Asp. niger* sobre amberlita, presenta una fase lag o de retardo entre 9 y 10 horas, mientras que la fase exponencial o de crecimiento se mantiene hasta las 23 horas y la fase de mantenimiento o estacionaria a partir de las 23 horas de fermentación. Este comportamiento es muy similar al reportado por Oriol (Crecimiento de *Asp. niger* sobre yuca (1988)). Al respecto cabe mencionar que aunque el crecimiento sea similar no es tan abundante como en el caso de Oriol. Nosotros alcanzamos un máximo de 7.27 mg de proteína por gramo de soporte seco. La cinética de consumo de azúcares (fig. 26.1) presenta un perfil, que nos permite correlacionar las diferentes fases de crecimiento del hongo, con la cinética de proteínas. Si a esto añadimos que el consumo de azúcares al finalizar el proceso (30 horas) es del 90 %, teniendo así un rendimiento del sustrato (Y_s) = 0.1679 mg biomasa/mg de sustrato consumido, y un rendimiento de transformación de azúcares a proteínas (R_x) del orden de 0.067 lo cual representa un 6.7 %. La tasa específica de crecimiento (μ), fue calculada a partir de la cinética de proteínas. Para poder conocer μ , la cinética de proteínas se ajustó a un modelo logístico. El cual supone que el crecimiento es tal que para ($K > 0$):

$$\frac{dw}{dt} = \frac{Kw(\alpha - w)}{\alpha} \quad (1)$$

Integrando la ecuación (1), tenemos:

$$w = \frac{\alpha}{1 + Be^{-kt}} \quad (2)$$

Esta función es conocida como función de crecimiento logístico. Esta curva tiene forma de S. Notese que para $t=0$

$$w = \frac{\alpha}{1 + B} \quad (3)$$

y cuando $t = \infty$ $w = \alpha$. Por lo tanto α y B son las condiciones iniciales de la función y α es el valor asintótico de la función para $t \rightarrow \infty$ y para poder tener el ajuste $B > 0$.

Si tomamos de la ecuación (2) e^{-kt} y del modelo de crecimiento lineal (Monod) tenemos que:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu) X \quad (4)$$

integrando y reorganizando la ec. (4) tenemos:

$$X = e^{(\mu)t} + X_0 \quad (5)$$

podemos observar que en la ec. 4, $e^{(\mu)t}$ y en la ec. 2, e^{-kt}

por lo tanto $-k = (\mu)$ la cual representa la tasa específica de crecimiento. Aplicando el modelo logístico, para nuestros datos, tenemos la siguiente función.

$$f(x) = \frac{A * e^{(c*x)}}{1 + B * A * e^{(c*x)-1}} \quad (6)$$

Donde:

$$A = 0.312$$

$$B = 0.132$$

$$C = 0.224$$

si correlacionamos la ec. 4 con la 6, podemos ver que:

$$\alpha = A$$

$$B = B$$

$$k = C$$

Por lo tanto la tasa específica de crecimiento (μ) = 0.224 1/hrs.

El perfil de velocidad de consumo de O_2 (fig. 26.2), presenta un perfil similar al de la proteína, de donde se puede observar que existe una diferencia de 4 a 5 horas entre la máxima actividad respiratoria y el tiempo de biomasa máxima, estos resultados corroboran lo reportado por Oriol (1988) en donde él encuentra una diferencia de 2-3 horas, para *Asp. niger* sobre almidón de yuca. El hecho de que nosotros tengamos un mayor intervalo de tiempo, puede atribuirse al consumo de azúcares en nuestro caso al llegar a la fase de mantenimiento el consumo es del 85 %. Si tomamos en cuenta que parte de esta azúcar la utiliza el hongo en respiración lógico es que al faltar azúcar en el medio el coeficiente respiratorio tendera a bajar, esto se puede ver en la (fig 26.2) ya que el QR durante las primeras horas se mantiene constante en un valor de 1, posteriormente empieza a bajar. Retomando lo anterior y graficando el O_2 consumido contra el consumo de azúcares obtenemos una relación de 0.137 moles de O_2 consumido por cada miligramo de azúcar consumida (fig.26.3) con una correlación de 0.98 si tomamos en cuenta que para oxidar una molécula de sacarosa se necesitan 12 moléculas de O_2 . Obtenemos que el 17.44 % de la sacarosa se consume en respiración.

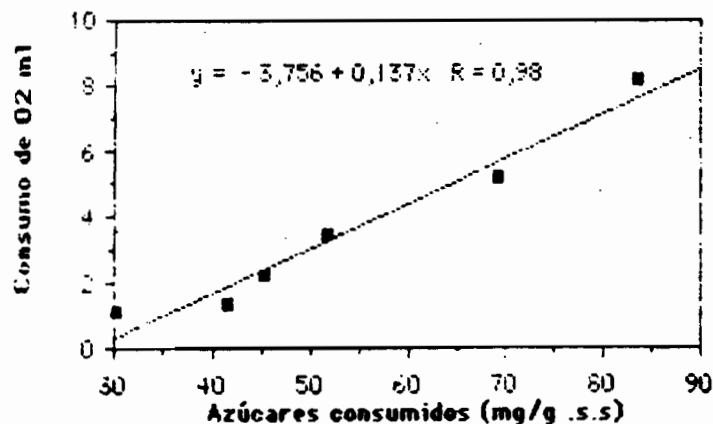
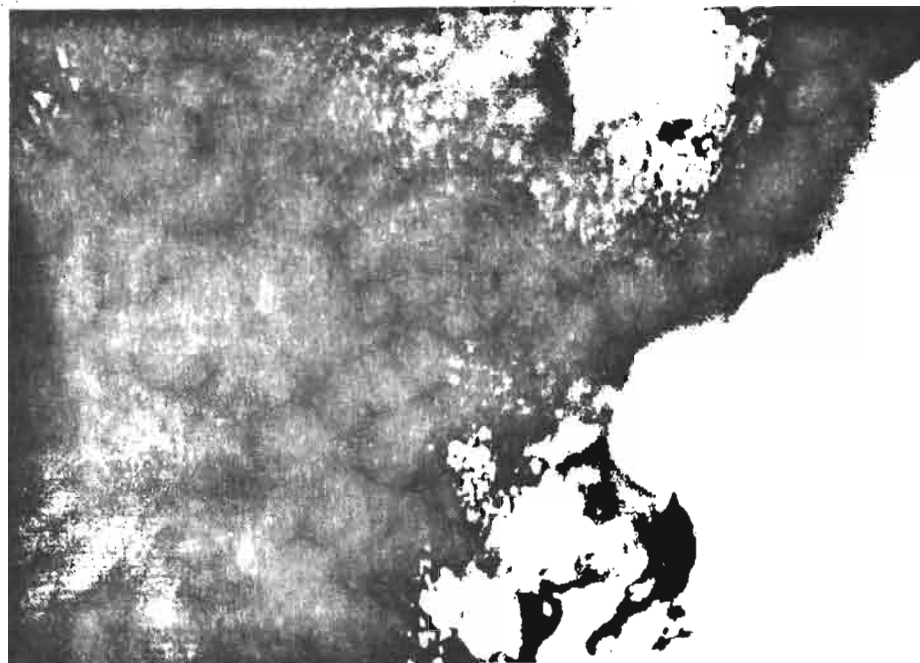


Fig. 26.3 Consumo de azúcares contra consumo de O_2

En este estudio se incluye el análisis de caída de carga (fig. 26.1). Se puede ver que el perfil de caída de carga se puede correlacionar muy bien con la cinética de crecimiento. Esto se atribuye a lo siguiente; conforme el hongo crece se genera una nueva fase sólida dentro del reactor, esta fase sólida es el micelio del hongo y es a nivel interparticular (foto. 26.1), ya que en este caso el hongo crece sobre el soporte y no dentro del mismo. Esto provoca que se genere una obstrucción al flujo de aire, generando así la caída de carga, para el flujo de 2 l/h, el máximo valor encontrado son 5 mm de agua desplazada. Este valor puede ser pequeño, pero lo interesante es que con este rango de valores se pueden conocer los puntos más importantes de la cinética de crecimiento, el inicio de esta y el momento en que entramos a la fase de mantenimiento 12 y 25 horas respectivamente. Por lo tanto, este parámetro resulta importante ya que esta caída de carga es consecuencia del crecimiento y mediante este podemos tratar de cuantificar una medida de biomasa indirecta, correlacionando ambos.



Fotografía 26.1 Observación al microscopio del crecimiento de Asp. niger sobre el soporte. Escala de referencia 1 cm = 91.6 micras

Mediante el perfil de pH (fig. 26.4) se puede observar que durante las primeras horas, se mantiene constante ya que nos encontramos en la fase de acoplamiento. Posteriormente se puede observar una rápida acidificación, esta es en el periodo de de la fase de crecimiento. Finalmente a partir de la 25 horas se presenta un ligero incremento, el cual se puede atribuir a que el hongo entra en una etapa de autólisis.

Por lo que respecta a la Aw (fig. 26.5), cabe mencionar que la precisión de los valores es de 0.003 y que el rango de las medidas es pequeño. Sin embargo se puede observar que durante la fase lag se mantiene constante la Aw con un valor de (0.977), posteriormente se ve una tendencia de incremento en la parte de crecimiento hasta llegar aun valor máximo de 0.984. Esto es debido a que el hongo es capaz de imponer una cierta actividad de agua con un valor cercano a 1 (Oriol y col. 1989). Aunque también es posible que la disminución de los azúcares pueda favorecer esta tendencia.

Con respecto a la humedad (fig. 26.5), esta se mantiene casi constante en promedio 57 % (base húmeda), tan solo perdiendo un 2 %. Esto es importante ya que observando la (fig. 26.6), vemos que la distribución del tamaño de partículas contra el tiempo no se ve afectada por variaciones drásticas en la humedad, teniendo así una variación del diámetro mediano (DA), que oscila entre 630 y 640 micras (fig. 26.7), con una dispersión del 5 % aproximadamente. Este (DA) fue obtenido de la gráfica de barras (fig. 26.6). El hecho de que el flujo de aire no varíe durante la fermentación se debe al uso de una microválvula de alta precisión, además en promedio el diámetro medio de la distribución de partículas no cambia a través del tiempo, la caída de carga que ocurre es debida unicamente al crecimiento del hongo que se lleva a cabo en el espacio interpartícula.

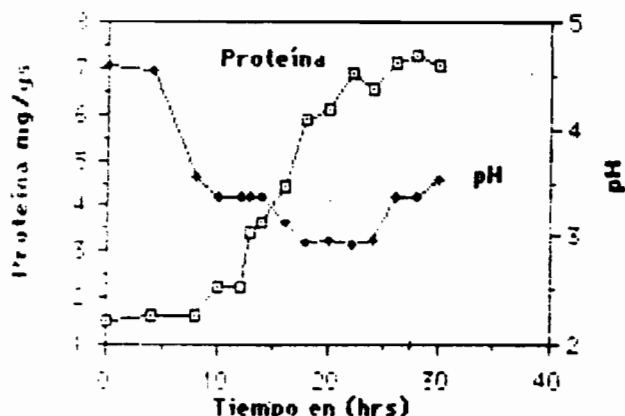


Fig. 26.4 Comparación de los perfiles de crecimiento y pH.

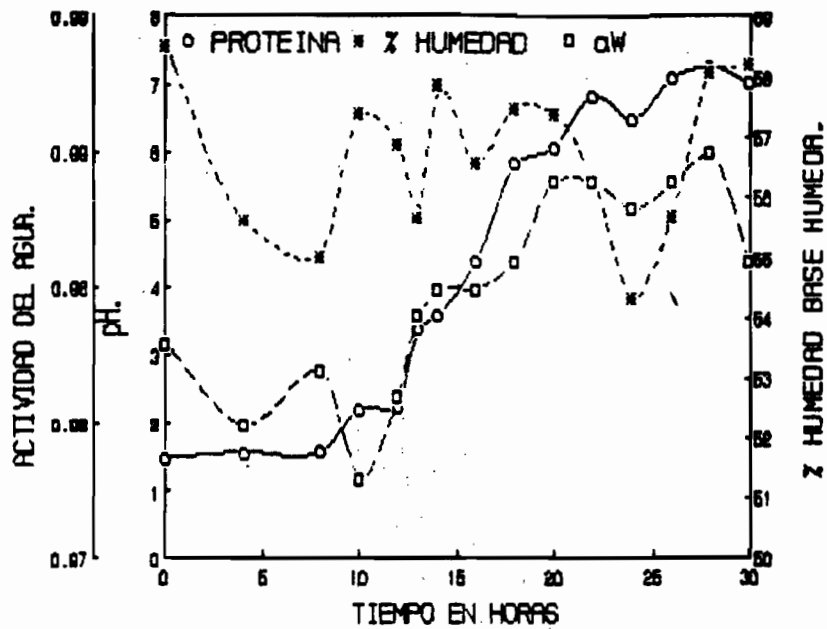


FIG. 26.5 Cineticas de proteina, % de Humedad y aW.

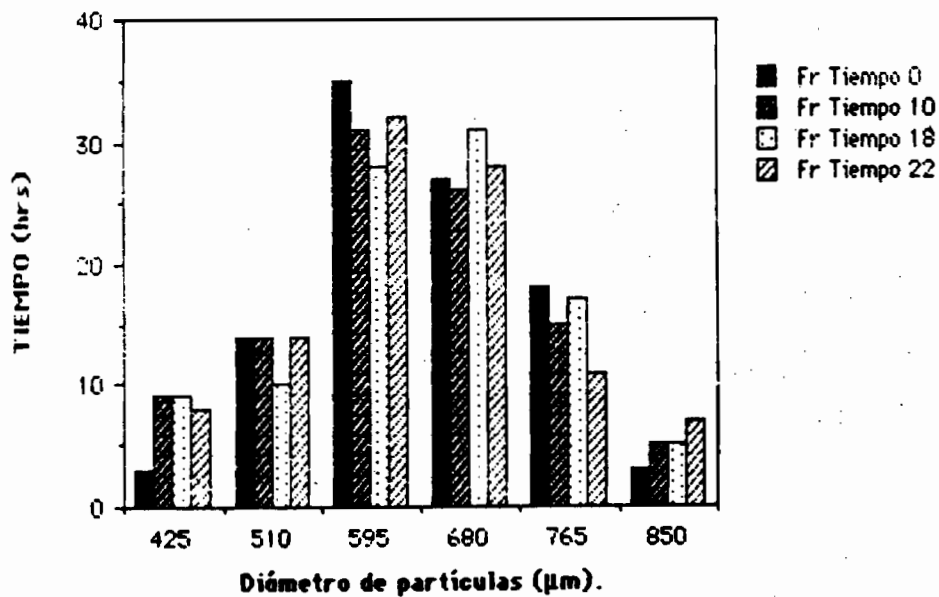


Fig. 26.6 Variación del espectro de partícula a través del tiempo.

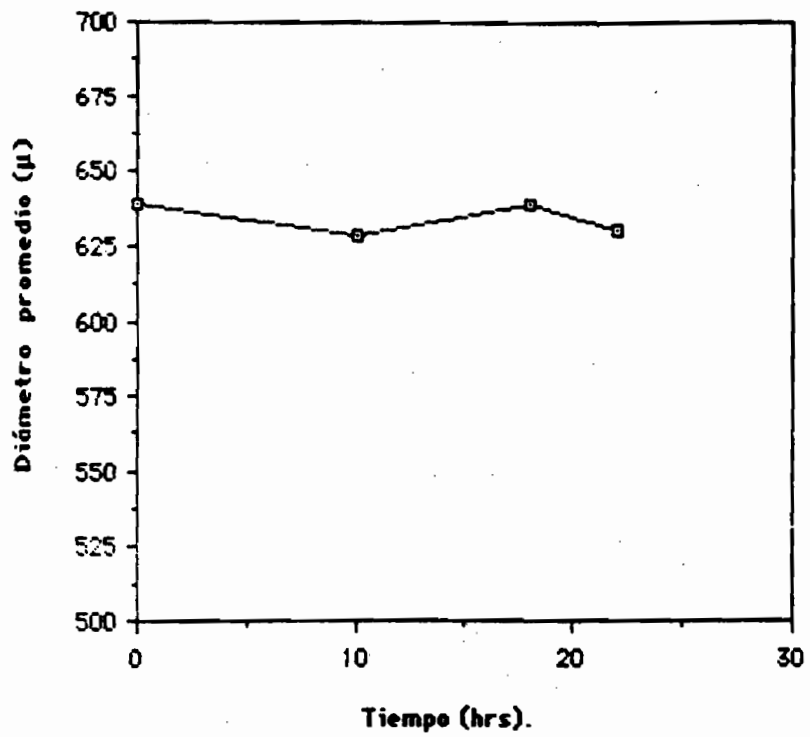


Fig. 26.7 Variación del diámetro de partícula obtenido de la (fig. 26.6).

F. CONCLUSIONES PARTE III.

El estudio de caracterización de crecimiento de Asp.niger, sobre amberlita IRA-900, esta basado en la distribución homogénea del medio de cultivo así como del inóculo, además de un pH inicial adecuado, una humedad y temperatura óptimas. Todos estos parámetros permiten un crecimiento selectivo del hongo. Debido a la alta concentración de esporas no se requieren condiciones asepticas para el proceso. Lo cual permite comprobar una de las ventajas de la FES. sobre la fermentación líquida.

En esta parte del trabajo se encontraron resultados interesantes, el primero es que el crecimiento del hongo se lleva a cabo sobre la partícula, formando una especie de malla alrededor de la esfera. Además este crecimiento genera información para la cuantificación de la caída de carga. Este punto es importante ya que anteriormente en otros trabajos no se había tomado en cuenta. al parecer se puede encontrar un factor de correlación que relacione la biomasa con la caída de carga. Por otra parte el trabajo presenta algunas ventajas una de ellas es que separamos en un 100 % la biomasa del soporte con relativa facilidad. Lo que permite que las pruebas de cuantificación de proteínas y azúcares sean rápidas y reproducibles. Los resultados encontrados pueden ser comparados con estudios de crecimiento para Asp. niger en soportes de tipo orgánico. Aunque los resultados encontrados son menores que los reportados para los estudios mencionados. Cabe señalar que parte de los objetivos de este trabajo era la caracterización del crecimiento del hongo sobre el soporte y no la de optimización. Por lo que respecta al soporte se observó que este no se deforma durante el crecimiento del hongo, así como la variación del tamaño de partícula se mantiene en un rango constante. Este soporte permitió hacer más sencillos los análisis así como tener un mejor control sobre el proceso.

S 27 CONCLUSION GENERAL.

La importancia de un soporte modelo esta basada en las ventajas y características del mismo. Debido a esto se selecciono un soporte bajo los criterios de: inhibidores, capacidad de retención de agua y conocimientos de parámetros fisicoquímicos. El soporte seleccionado fue la amberlita IRA-900. Esta presenta las siguientes ventajas para el estudio basico de FES. Estas ventajas son:

- No presenta inhibidores para el crecimiento de Asp.niger
- Tiene una alta capacidad de retención de agua sin presentar fenómenos de drenaje macroscópicos.
- Conocemos bastante información sobre dicho soporte: forma, tamaño, porosidad, selectividad, etc.

Las características que presenta el soporte seleccionado permitio evidenciar el tipo de crecimiento del hongo. Esto es el tiempo en que se llevan a cabo cada una de sus fases de crecimiento, fase lag, fase exponencial y fase estacionaria, así como el tipo de crecimiento dentro del reactor, que es a nivel interpartícula.

Por otra parte este tipo de crecimiento permite evidenciar que la formación de una nueva fase sólida dentro del reactor, esto es el crecimiento del hongo, que genera un efecto en la caída de carga. Este fenómeno no habia sido correlacionado anteriormente, pero puede correlacionarse para tratar de cuantificar la biomasa de manera indirecta.

También se observo que durante el crecimiento no hay una destrucción de la matriz ni deformación del soporte. Por lo que respecta a la cuantificación de biomasa y azúcares parece más sencilla que con soportes de tipo orgánico. En el caso de la biomasa esta es separada en su totalidad del soporte mediante una separación mecánica, además el soporte no es fragmentado por lo que puede reutilizar mediante un tratamiento adecuado.

Con lo anterior se puede ver que el soporte seleccionado puede ser utilizado como un soporte modelo en estudios experimentales a nivel de diseño de reactores así como en el modelamiento matemático.

Finalmente por lo que respecta a este trabajo, el objetivo de caracterizar el crecimiento de Asp niger sobre el soporte se cumplió ampliamente, ya que se conoce el tipo de crecimiento sobre el mismo y el tiempo que tarda. Pero existe un factor importante no se tiene un alto contenido de biomasa y el consumo de azúcares es del 90 % debido a esto si se quiere optimizar el crecimiento del hongo es necesario incrementar la cantidad de azúcar inicial, ya que en nuestro caso el sustrato (azúcar) puede jugar un papel limitante teniendo así un bajo contenido de biomasa.

S 28 BIBLIOGRAFIA.

-Barrios, J., Fermentación sólida de la yuca control de calidad y nuevos productos desarrollados., Tercer informe técnico semestral., 27-Enero-87., UAM-I.

-Carrizalez, V., Rodriguez, H., Sardifa, I., (1981) Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. Biotechnology and bioengineering., 23, 321-333.

-Durant, A., Chereau, D., (1988) A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar Beet pulp. Biotech. Bioeng., vol. 31. 476-486.

-Gervais, p., Bazelin, C., (1986) Development of a solid-substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. Biotechnology Letters., 8 (3), 191-196.

-Georgiou, G., Shuler, M. L., (1986) A computer model for the growth and differentiation of a fungal colony on solid substrate. Biotech. Bioeng. vol. 28, 405-416.

-HESSELTINE, W., C., (1972) Biotechnology report (solid state report). Biotechnol. Bioeng., 14, 517-532.

-Jenneke, k., Cimerman, A., Perdin, A., (1986) Comparasion of different methods for protein determination in Aspergillus niger mycelium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 445-448.

-Kim, J. H., Hosobuchi, M., Rym, D. D. Y., (1985) Cellulase production by a solid atate culture system. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 27, 1445-1450.

-Laukevics, J. J., Apsite, A. F. Viesturs, U. S., tergerdy. R. P., (1985) Steric hidrance of growth of filamentous. fungi in solid sibstrate fermentation of wheat straw. Biotech. Bioeng. Vol. 27, 1687-1691.

- Lonsane, B. K., Ghilyal, N. P., Budiartman, S., Ramakrishna, S. V., (1955) Review engineering aspects of solid state fermentation., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7, 258-265.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mitchell, P. F., Greenfield and H. W. Duelle., (1986) a model substrate for solid-state fermentation. *Biotechnology Letters.*, 8 (11), 827-832.
- Montgomery, R., (1961) *Biochem. Biophys. Acta*, 48, 591.
- Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Atthasampunna, P., Taguchi, H., (1984) Control of water content in a solid-state culture of Aspergillus oryzae. *J. Ferment. Technol.*, 62 (5), 453-459.
- Oriol, E., Cultivo sobre soportes impregnados. Informe interno. Datos no publicados.
- Oriol, E., (1987) Croissance de Aspergillus niger sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. tesis de doctorado. ORSTOM-UAM-I.
- Oriol, E., Rimbault, M., Rousos, S., Viniegra, G. G., (1988) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava by Aspergillus niger. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 27, 498-503.
- Oriol, E., Shetino, B., Viniegra, G., Rimbault, M., (1988) Solid-state culture of Aspergillus niger on support. *J. Ferment. Technol.*, 66, 57-63.
- Quintero, R. R., Ingeniería bioquímica teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana. México 1981.

-Raimbault, M., Alazard, A., (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 9, 199-209.

-Rohm and Hass. Ion exchange and polymeric adsorption technology in medicine, nutrition and pharmaceutical industry. Rohm and Hass company. 1987.

-Rohm and Hass. Ion exchange resins laboratory guide. Rhom and Haass company. 1988.

-Sato, K., Nagatani, M. S. S., (1982). A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. J. ferment. Technol., 60 (6), 607-610.

-Sato, K., Nagatani, M., Nakamura, K. I., Sato, S., (1983) Growth estimation of Candida lipolytica from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. J. Ferment. Technol., 61 (6), 623-629.

-Wei, C. J., Tanner, R. D., Woodward, J., (1983) Elucidating the transition between submerged culture and solid-state bakers' yeast fermentations. Biotech. Bioeng. Symp. No 11, 541-553.

ANEXO II

**ESTUDIO EN REACTOR DIFUSIVO ISOTERMICO
DE LOS PARAMETROS DE LA CINETICA
DE CRECIMIENTO DE Asp. niger.**

1. INTRODUCCION

La fermentación en estado sólido es un conjunto de fenómenos bastante complejo que acopla la biología y la termodinámica. Si influyen las condiciones de cultivo (medio de cultivo, microorganismo, concentración de los elementos,.....), no se debe olvidar que el microorganismo tiene que desarrollarse en un ambiente bien específico. En la mayoría de los casos se sopla en los reactores un aire de composición en oxígeno de un 21 % y en dióxido de carbono de un 0 %. Sin embargo, otras condiciones pueden ser las mas apropiadas para el crecimiento o la producción de metabolitos. Ciertos autores mostraron que las condiciones ambientales podían influir sobre el crecimiento del hongo y la producción de los metabolitos (Bajaracharya y col., 1980).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es, en primer lugar, buscar un sistema físico de reactor en el cual se podrían desacoplar los fenómenos esenciales que ocurren durante una fermentación. Es decir un sistema en dónde se puede minimizar un fenómeno a fin de simplificar la interpretación de los resultados.

Ratbun y Shuler (1983) estudiaron en un reactor no isotermico la difusión del O_2 y CO_2 con un sustrato de soya. Sin embargo no pueden llegar a conclusiones por el hecho que el soporte es complejo y tambien que existen tres fenomenos acoplados: difusión gaseosa, transporte térmico y crecimiento del hongo.

Para este estudio usaremos el soporte modelo ya bien caracterizado (anexo I) por el cual conocemos un máximo de parámetros fisicoquímicos. Diseñaremos un reactor de tipo isotermico para quedarnos solamente con dos fenomenos: difusión y crecimiento. En este reactor se desarrollará durante la fermentación un gradiente axial de CO_2 y O_2 a fin de estudiar la influencia de este gradiente sobre el crecimiento.

3. DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El sistema experimental usado en la realización de los experimentos se encuentra esquematizado en la figura II.1d y consta esencialmente de:

1. **Suministro de aire** por medio de una bomba de 1/4 de Hp. El flujo de aire pasa antes de entrar al saturador por un presaturador el cual se encuentra a una temperatura de 34 °C regulada con el empleo de una parilla eléctrica.
2. **Saturador.** El recipiente contiene agua destilada al igual que el presaturador y el aire se suministra es en forma de pequeñas burbujas empleando para esto pequeños burbujeadores comerciales.
3. **Válvulas de bronce.** Son utilizadas para regular el flujo de aire independiente para cada reactor.
4. **Termopares.** Son de tipo K cromel-alumel y contribuyen a la medida de la temperatura a las diferentes alturas del reactor.
5. **Amberlita.** Es el soporte experimental.
6. **Tapones.** En todos los sitios de la columna de muestreo son colocados tapones especiales que facilitan la experimentación en cualquiera de los casos ya sea el gradiente de temperatura o el de dióxido de carbono-oxígeno.
7. **Incubadora.** Es el sitio específico donde se lleva a cabo la fermentación a una temperatura de 35 °C.
8. **Cromatografo de gases.** Se emplea para medir las concentraciones de O_2 y CO_2 a dentro

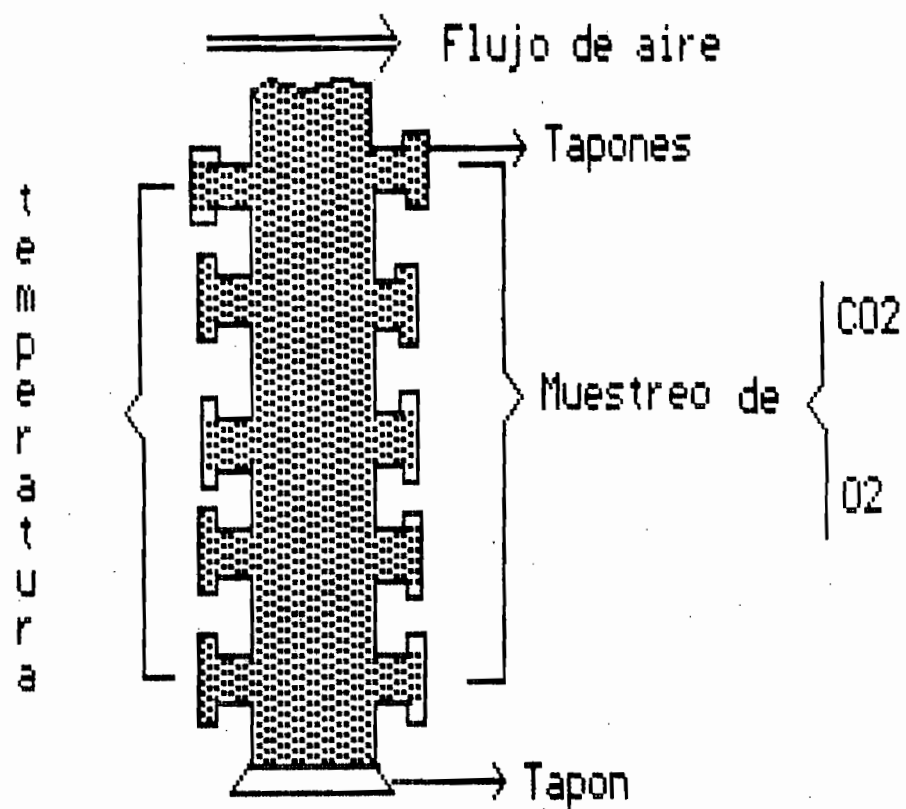


Figura II.1 a: Reactor con muestreos

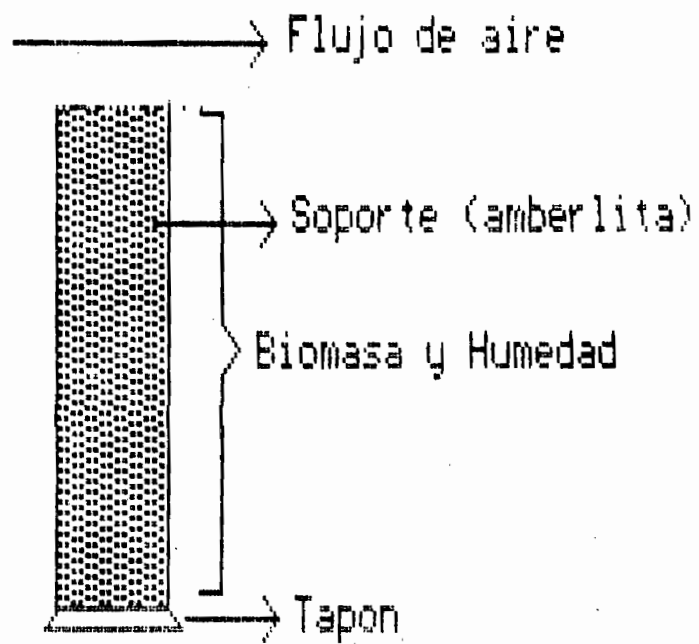


Figura II.1 b: Reactor para las medidas de los parametros biologicos

VISTA FRONTAL DE LA CÁMARA DE FERMENTACION

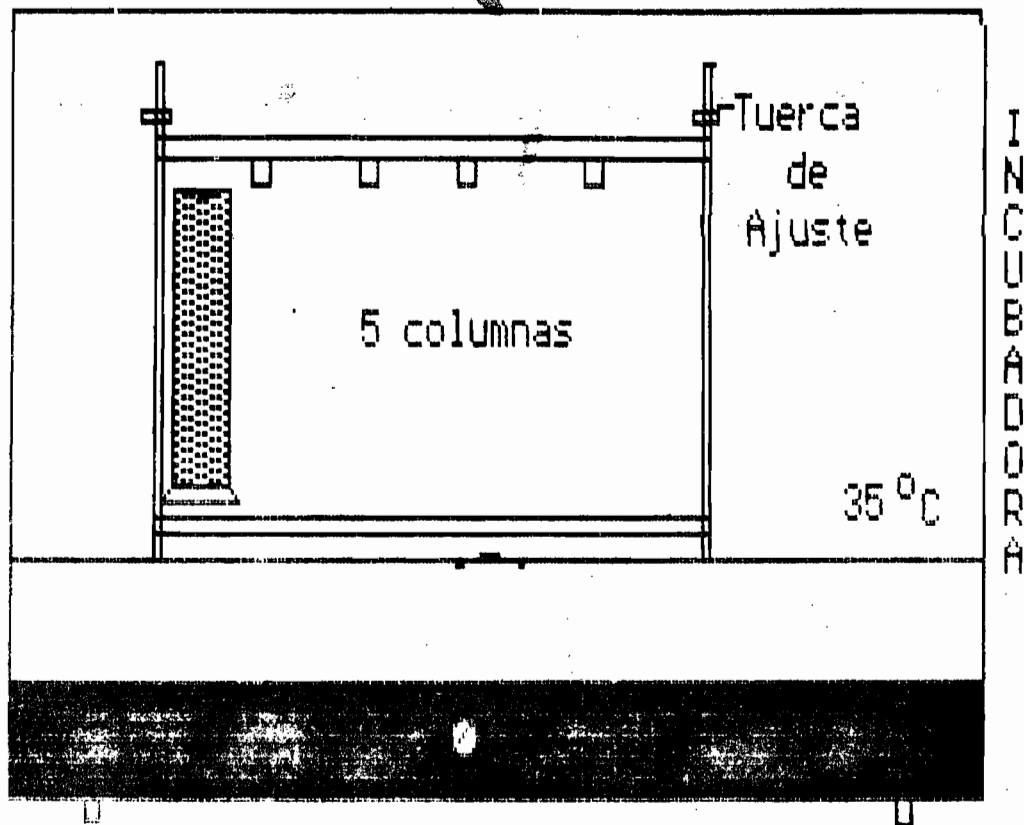


Figura II.1 c: Dispositivo experimental

SISTEMA EXPERIMENTAL

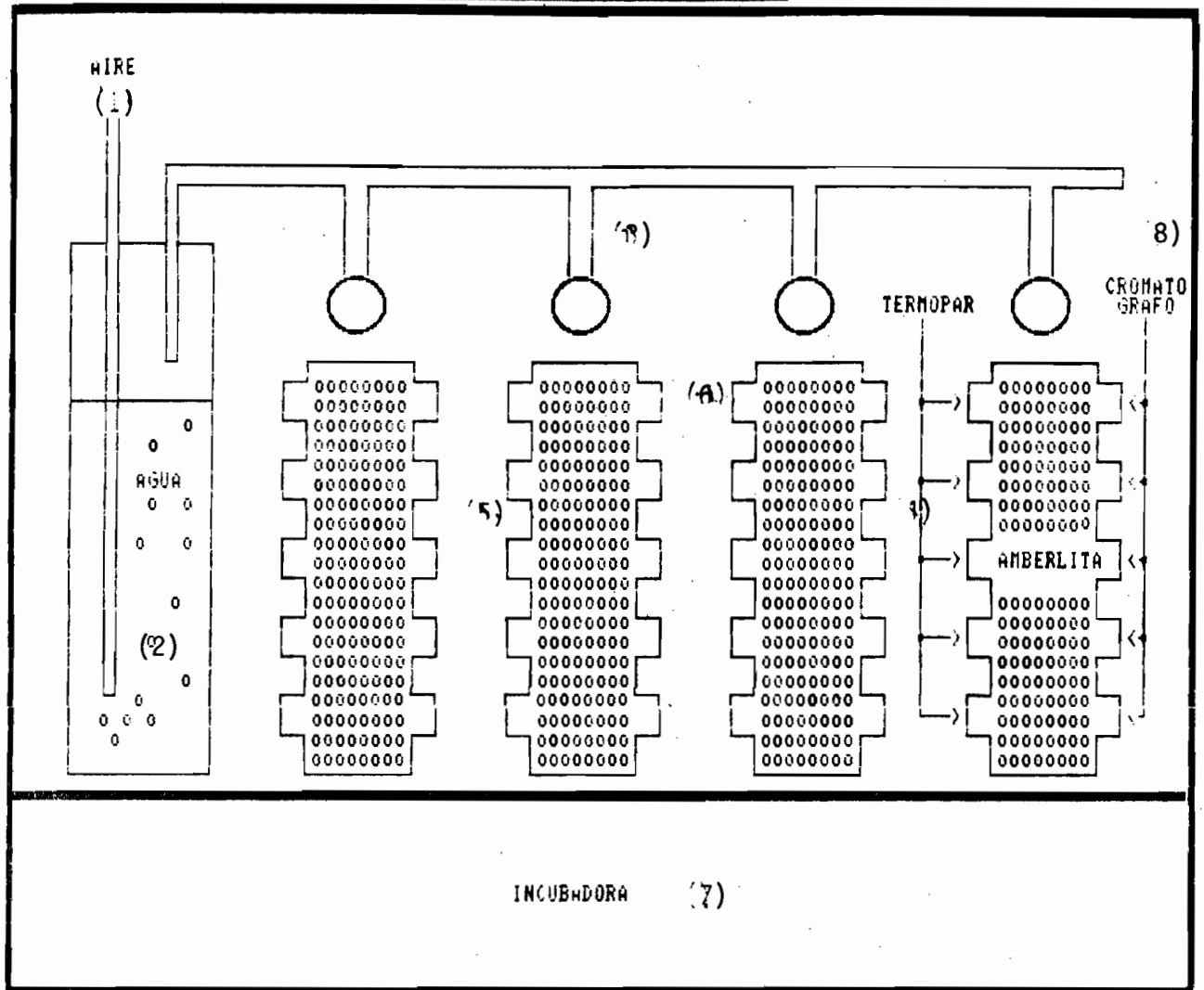


Figura II.1d:Dispositivo experimental completo

de la columna.

Se utilizaron dos tipos de columnas que miden 8 cm de largo por 2 cm de diámetro (fig. II.1a-b). Una de ellas tiene orificios de aproximadamente 0.5 cm de diámetro a lo largo de la columna que sirvieron para muestrear la evolución del oxígeno consumido y dióxido de carbono producido empleando jeringas de 100 μ l. Además estos orificios sirven para medir los gradientes de temperaturas. Los orificios al igual que la parte inferior de la columna se encuentran tapados con tapones de hule. La otra columna también se encuentra tapada por la parte inferior, pero no tiene orificios a lo largo. Esta se usó para las medidas de pH, humedad, biomasa.

4. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Las condiciones experimentales son las siguientes:

- el medio de cultivo y las diferentes concentraciones de elementos usados son similares a los del anexo I (p. 72).
- La temperatura de incubación es de 35 °C.
- El flujo de aire que se impone en la parte arriba del reactor perpendicularmente a la dirección Z, es de 10 l/hr.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Variación de la temperatura y de la humedad relativa del aire

Se presenta figura II.2 la variación contra el tiempo de la temperatura del aire y de la humedad del aire medidos en el flujo de aire en la parte arriba del reactor. Se observa que la temperatura del aire se queda constante durante toda la fermentación en un valor de 34.6 °C. Este valor es similar en promedio a la temperatura que se mide en el reactor (fig. II.3).

La humedad relativa del aire (HR) medida con el sensor de bulbo seco y húmedo es constante durante toda la fermentación. El valor se queda en promedio a un 97 %.

4.2 Perfiles de temperatura, humedad, pH y biomasa.

Se presenta figura II.3 los perfiles de temperatura obtenidos por diferentes tiempos de fermentación. Se observa que no existe gradientes en el lecho y que en promedio la temperatura se queda en un 34.5 °C., temperatura similar a la temperatura superficial del aire (fig. II.2). Podemos ya concluir que el reactor no presenta gradientes de temperatura y que no existe transporte por conducción térmica en la dirección Z.

En la figura II.4 observamos que la humedad del soporte se queda a un 58 % \pm 1.5 % durante toda la fermentación. Tampoco se observa ningún gradiente de humedad en la dirección Z.

El pH (fig. II.5) disminuye de 4.9 a 3 de manera similar a lo que se encontró con un reactor convectivo (anexo I, p.80, fig.26.4). No presenta gradientes axiales durante la fermentación.

Se presenta en la figura II.6 perfiles de biomasa a diferentes tiempos de fermentación. Se observa un aumento en la biomasa de arriba hacia abajo del reactor. Los valores de biomasa obtenidos son comparables a los obtenidos en reactor convectivo (anexo I., p.75, fig. 26.1).

4.2 Perfiles de CO₂ y O₂. Balance de materia.

Se presenta en las figuras 11.6 bis y 11.8 las variaciones contra el tiempo del CO₂ y O₂ medidos a diferentes alturas del reactor. Las figuras 11.8 y 11.10 nos muestran los perfiles de CO₂ y O₂ a diferentes tiempos de fermentación. Podemos observar que alcanzamos un 12 % de CO₂ y un 8 % de O₂ en la parte baja del reactor. Existe un fenómeno de acumulación por el hecho que existe una resistencia de difusión. Usando un balance de materia de O₂ (eq. 1) y CO₂ (eq. 2) se puede calcular las tasas de producción de CO₂ (CDPR) y consumo de O₂ (OUR) en cada niveles del reactor y para diferentes tiempos.

$$\partial O_2 / \partial t = D_{O_2} \cdot \partial^2 O_2 / \partial^2 Z + OUR \quad (1)$$

$$\partial CO_2 / \partial t = D_{CO_2} \cdot \partial^2 CO_2 / \partial^2 Z + CDPR \quad (2)$$

D_{O₂}: coeficiente efectivo de difusión de O₂

D_{CO₂}: coeficiente efectivo de difusión de CO₂

t: tiempo

Z: axis de transporte.

Los coeficientes efectivos de difusión son coeficientes macroscópicos los cuales toman en cuenta la porosidad del lecho poroso.

Se presenta en las figuras 11.10, 11.11, 11.12 los valores de la tasa de consumo de O₂ a diferentes niveles para diferentes tiempos de fermentación. Se observa un aumento de la tasa contra el tiempo y un máximo en la parte baja del reactor. A este nivel del estudio se podría decir que el consumo de oxígeno es más rápido en la parte baja del reactor que en los primeros niveles. Este fenómeno sería bien correlacionado con un máximo de biomasa en el fondo de la columna (fig 11.6).

Con los valores de la tasa de consumo de oxígeno (OUR) y de la biomasa se puede deducir el coeficiente de actividad respiratoria QO₂. esta relación se escribe:

$$OUR = QO_2 \cdot X \quad (3)$$

X: Biomasa g seco/ g de soporte seco.

Presentamos figura 11.13 para los diferentes niveles del reactor la tasa de consumo de oxígeno (OUR) en función de la biomasa (X). El valor promedio del QO₂ es de 0.14 ml O₂/g h, valor similar al encontrado por RAIMBAULT (1980).

4.3 Influencia de las concentraciones de O₂ y CO₂ sobre el arranque de la fermentación

Se presenta en la figura 11.14 la variación de la biomasa en función del tiempo

para diferentes niveles. Observamos que existe en las primeras horas de la fermentación (fig.II.15) hay más biomasa abajo del reactor que arriba. Parece que el crecimiento del hongo podría ser más temprano o más rápidamente en el fondo del reactor debido a las condiciones de CO_2 y O_2 (fig. II.7 y II.9). La fase de germinación podría ser influenciada por las condiciones de CO_2 y O_2 diferentes a los que se encuentran de costumbre.

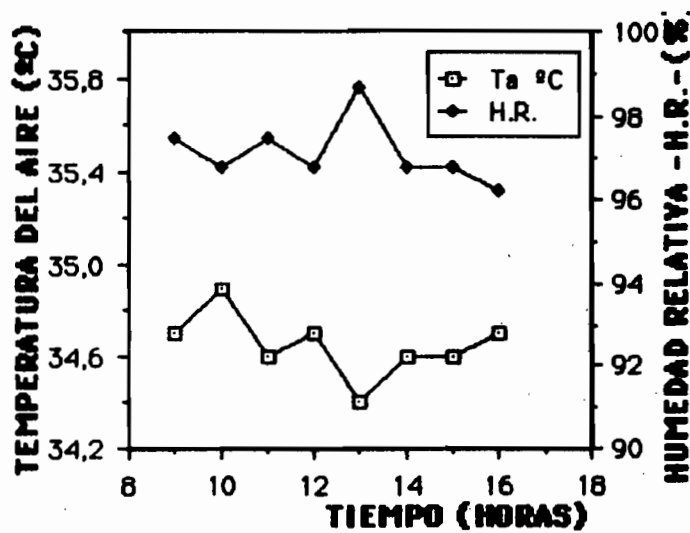


Fig.II.2: Variación de la temperatura y de la humedad relativa del aire contra el tiempo.

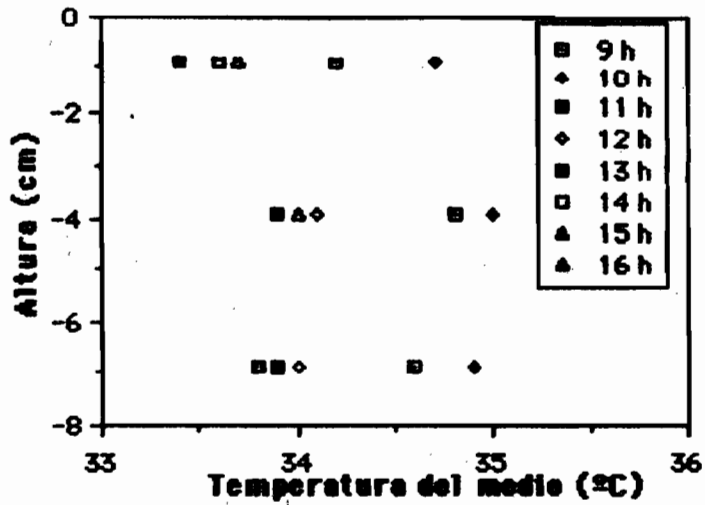


Fig.II.3: Variación de la temperatura del medio en función de la altura.

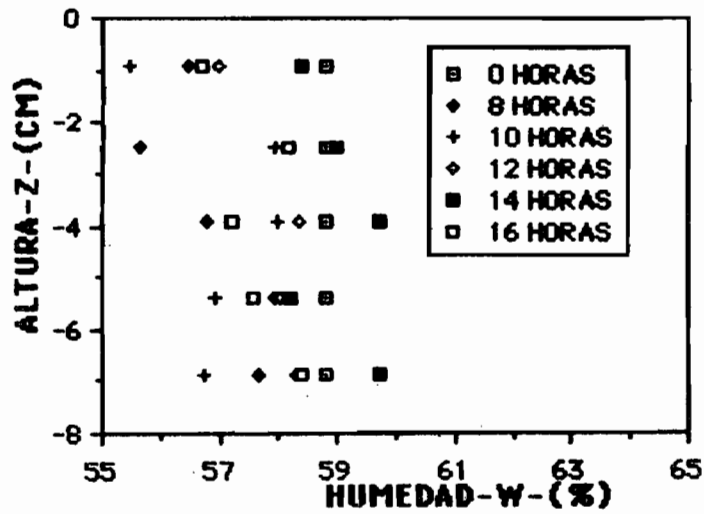


Fig.II.4: Variación de la humedad en función de la altura.

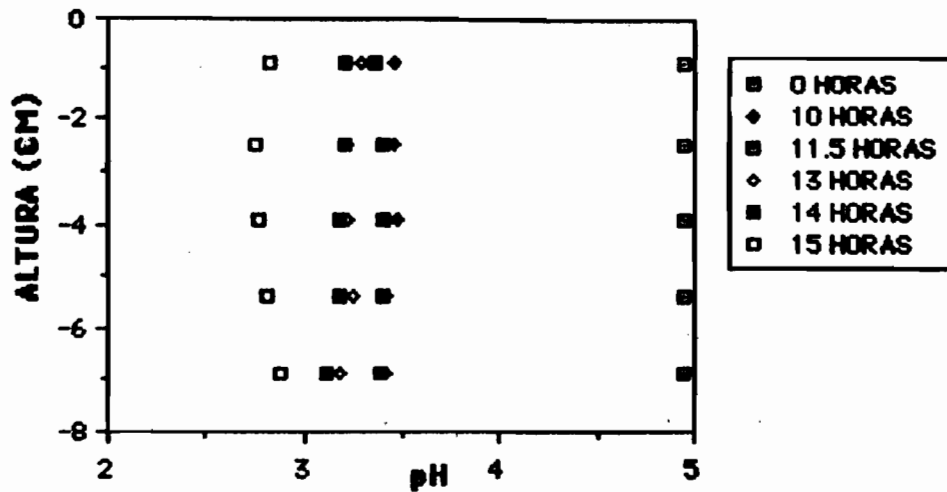


Fig.II.5: Variación del pH en función de la altura.

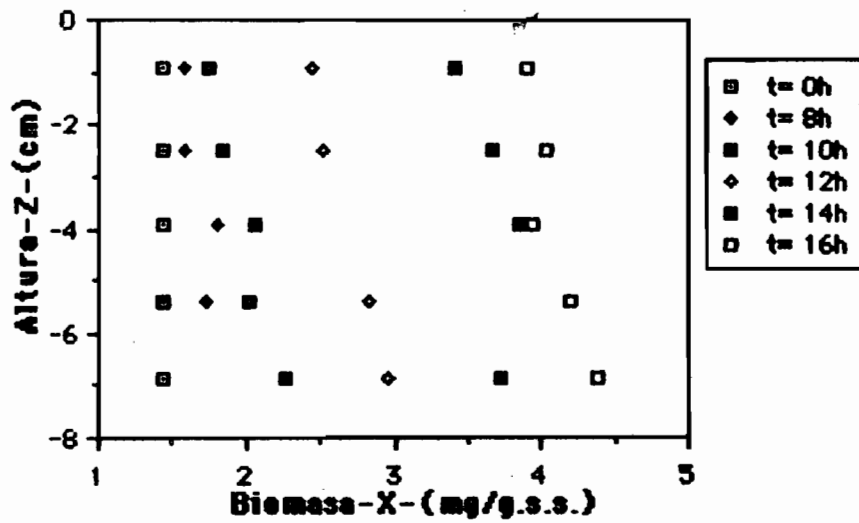


Fig.II.6: Variación de la biomasa en función de la altura.

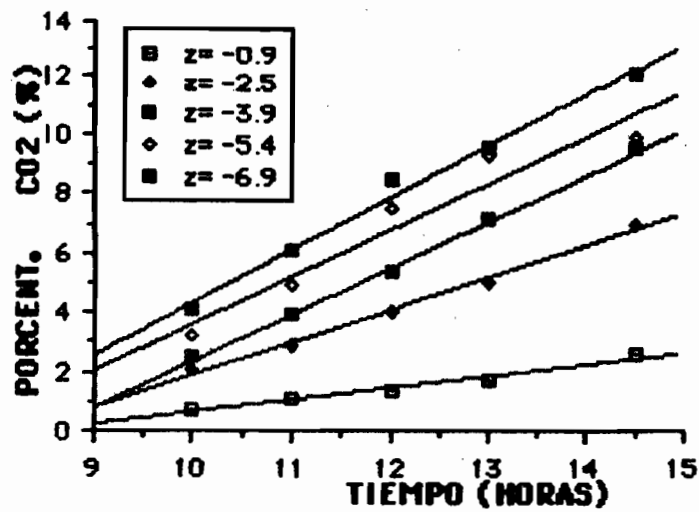


Fig.II.6 bis. Variación de la concentración de CO₂ producido contra el tiempo para diferentes alturas.

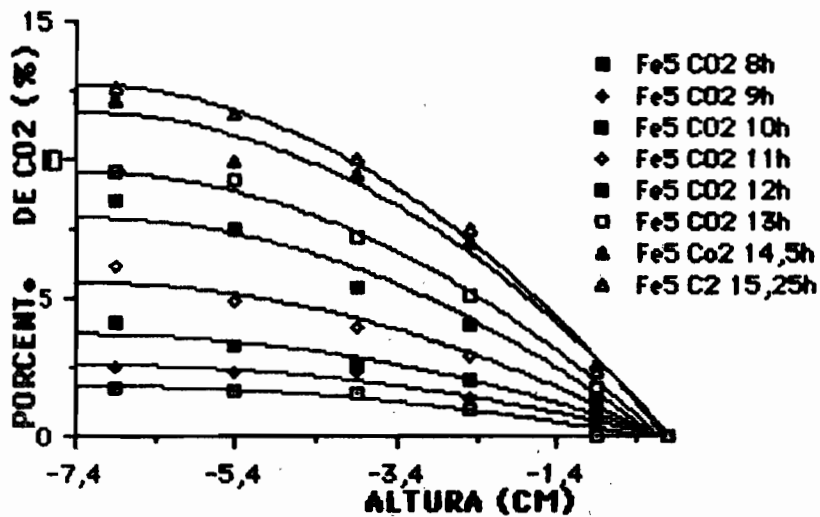


Fig.II.7: Variación de la concentración de CO₂ producido en función de la altura para diferentes tiempos.

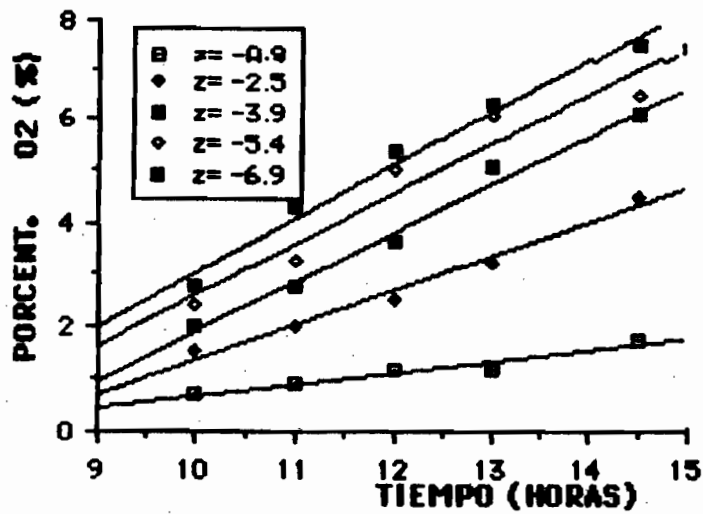


Fig.II.8: Variación de la concentración de O2 consumido contra el tiempo para diferentes alturas

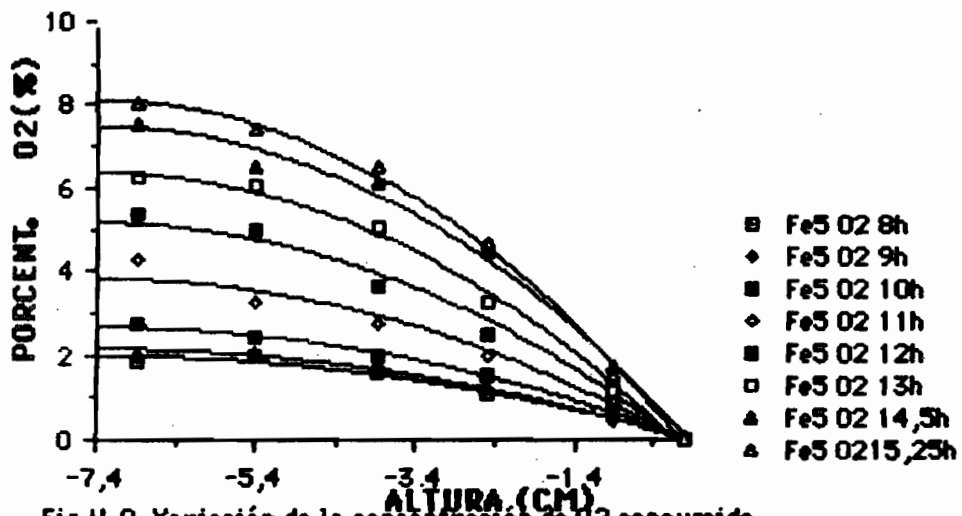


Fig.II.9: Variación de la concentración de O2 consumido en función de la altura para diferentes tiempos.

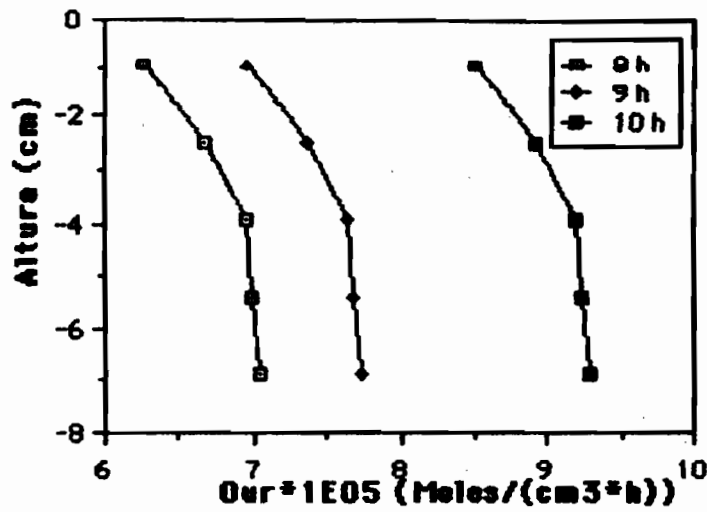


Fig.II.10: Variación de la tasa de consumo de O₂ en función de la altura para diferentes tiempos.

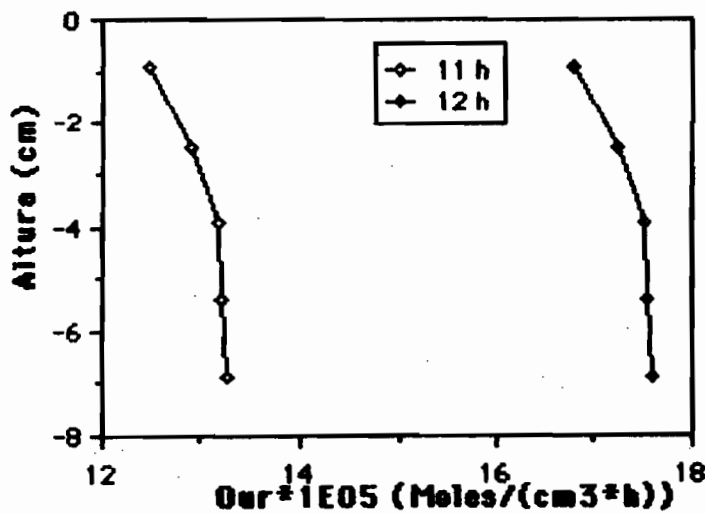


Fig.II.11: Variación de la tasa de consumo de O₂ en función de la altura para diferentes tiempos.

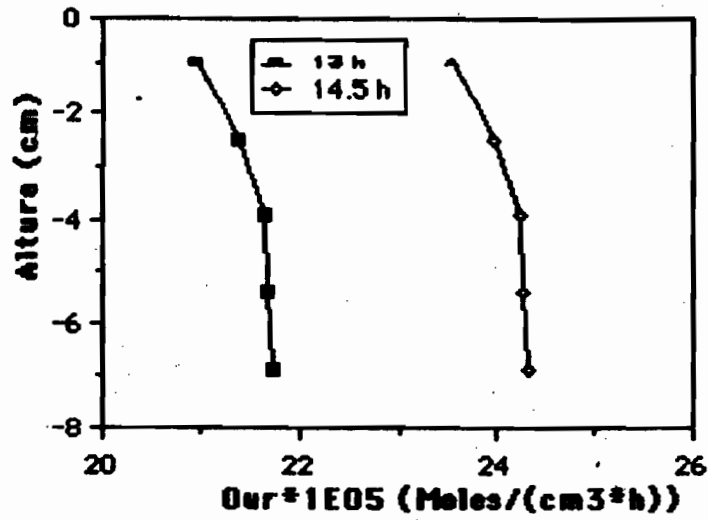


Fig.II.12: Variación de la tasa de consumo de O₂ en función de la altura para diferentes tiempos.

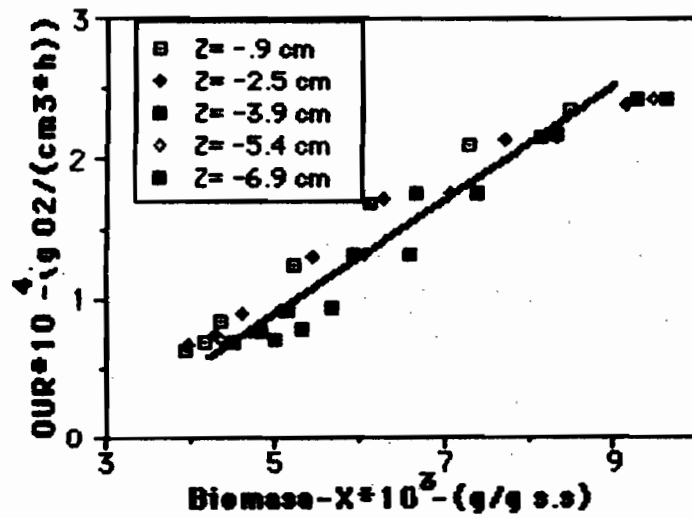


Fig.II.13: Determinación del coeficiente de la actividad respiratoria Q_{o2}

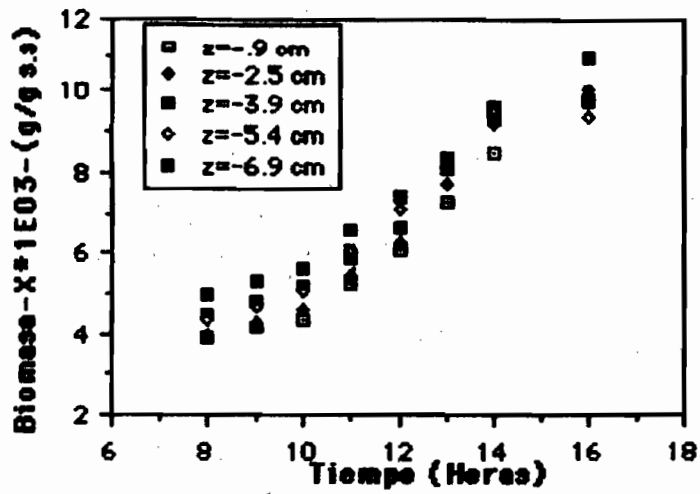


Fig.II.14: Variación de la biomasa contra el tiempo para diferentes alturas.

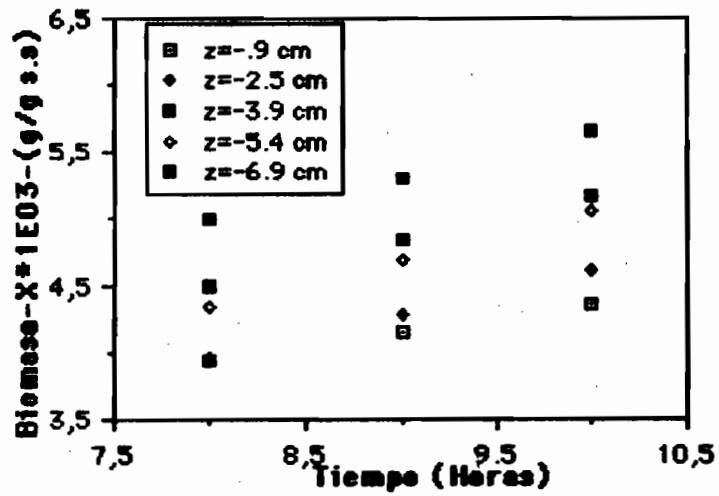


Fig.II.15: Variación de la biomasa entre 7.5 y 10.5 horas para diferentes alturas.

ANEXO III

**ESTUDIO EN REACTOR CONVECTIVO (1D)
DE LOS PARAMETROS TERMODINAMICO Y BIOLOGICO
DE CRECIMIENTO DE Asp. niger**

ANEXO III-1

1. INTRODUCCION

Como hemos visto en los anexos I y II hay necesidad de realizar estudios en sistemas simplificados que permitan conocer la interacción entre los fenómenos de transferencia de masa y calor y la cinética de crecimiento del microorganismo. Unos de los trabajos (H. Narahara y col., 1984) que existe en este campo muestran la necesidad de ampliar los conocimientos básicos para ir hacia un mejoramiento de la productividad de los reactores de FES. Los reactores estáticos y/ o de tipos mezclados necesitan un mejor control de los parámetros "termobiológicos". Dos esfuerzos son necesarios para lograr este objetivo: el primero escoger los parámetros que los más influyen en el desarrollo de la fermentación; el segundo es buscar los sensores los más adaptados para controlar el proceso.

2. OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue en primer lugar de diseñar un reactor modular de tipo convectivo en donde los fenómenos de transporte de masa sería unidireccional. Este reactor será instrumentado para manejar con precisión las condiciones termodinámicas de entrada del aire. Además, se pretende desarrollar una instrumentación alrededor del reactor para medir localmente las variables del sistema. Los primeros experimentos se harán empecando el reactor con el soporte modelo caracterizado en el anexo I de este reporte.

3. DESCRIPCION DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

El sistema experimental empleado, lo conforman: un panel de instrumentos, un

baño de temperatura constante y un reactor de lecho empacado.

El panel de instrumentos reúne el equipo de medición del sistema experimental y el equipo de alimentación, el reactor, de aire saturado. En la figura III.1 (foto 1) se muestra un diagrama del panel de instrumentos, en donde se alimenta aire, mediante una bomba de vacío (12) a dos humidificadores conectados en serie (15 y 17), los cuales cuentan con resistencias de calentamiento (14 y 16) que permiten mantener a temperatura constante la temperatura del punto de rocío del aire. previo a esto, el aire pasa a través de dos filtros (1 y 3) de aire, un manómetro (2) y un rotámetro (4) para regular el flujo deseado. El aire, una vez saturado, se alimenta al baño de temperatura constante.

El equipo de medición lo forman: un controlador de flujo (6), dos cajas de switch para termopar (7 y 8), un "display" o pantalla para la lectura de la temperatura (5), dos reguladores de voltaje para las resistencias de calentamiento (9 y 13), un cromatógrafo de gases (10) y su integrador (11).

El baño de temperatura constante provee de agua para la chaqueta de calentamiento del reactor, además de mantener la temperatura del aire (temperatura del aire seco) constante durante su trayecto hacia la entrada del reactor. Este baño consta, ver fig.III 2, de una conexión con chaqueta (18), que conduce el aire saturado en los humidificadores, aun depósito (19), el cual contiene dos trampas de agua (20 y 22) y un serpentín (21), a través de los cuales se hace circular el aire para después salir por otra conexión con chaqueta (24), hacia el reactor. En ambas conexiones, (18 y 24) se hace circular agua del depósito a través de sus respectivas chaquetas. Además, se cuenta con una bomba peristáltica (23) que proporciona un flujo de agua a temperatura constante para alimentar la chaqueta del reactor.

En las figuras III.3 (foto 2) se muestra un diagrama del reactor empleado, este consiste de 6 módulos (foto 3), de vidrio y acrílico, ensamblables (26) los cuales poseen 4 puertas para muestreo de gases (32), para termopares (33) y para manómetros de U. En este sistema el aire y el agua para la chaqueta, entran por la parte inferior del reactor, el aire atraviesa el lecho de amberlita y sale por la parte superior (29).

Se presenta en la figura III.4 una comparación entre la humedad relativa medida con el sensor (sensor de tipo bulbo seco y humedo) y la humedad relativa del sistema diseñado (16,17) y (21). Para el sistema la humedad relativa se deduce mediante una tabla (temperatura seca y de punto de rocío). observamos que el sistema de humidificación del aire funciona bien para un rango de humedad relativa de 60 % a 100%. El error que tenemos entre los dos (sensor-sistema) es menos de 1 %.

PANEL DE INSTRUMENTOS

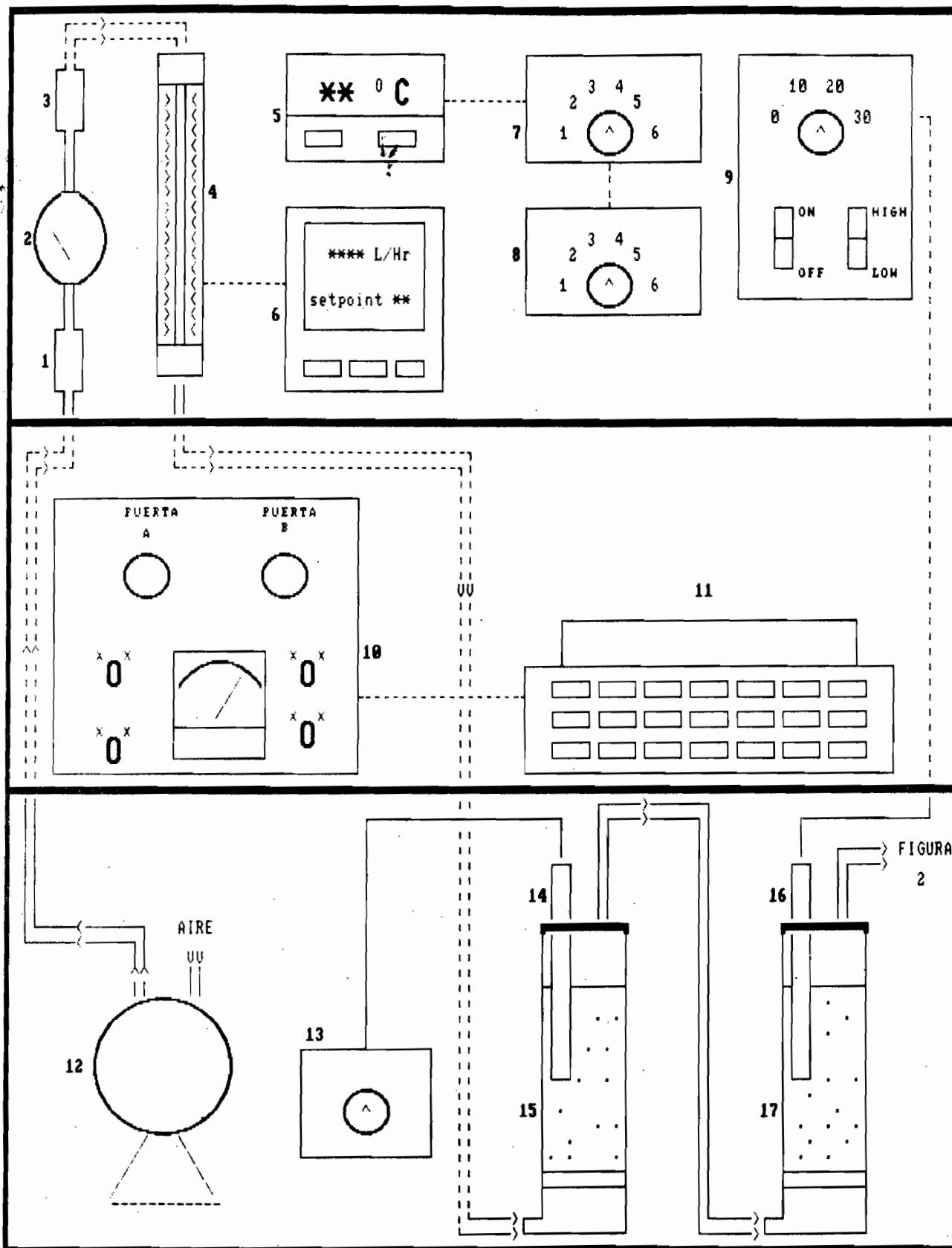
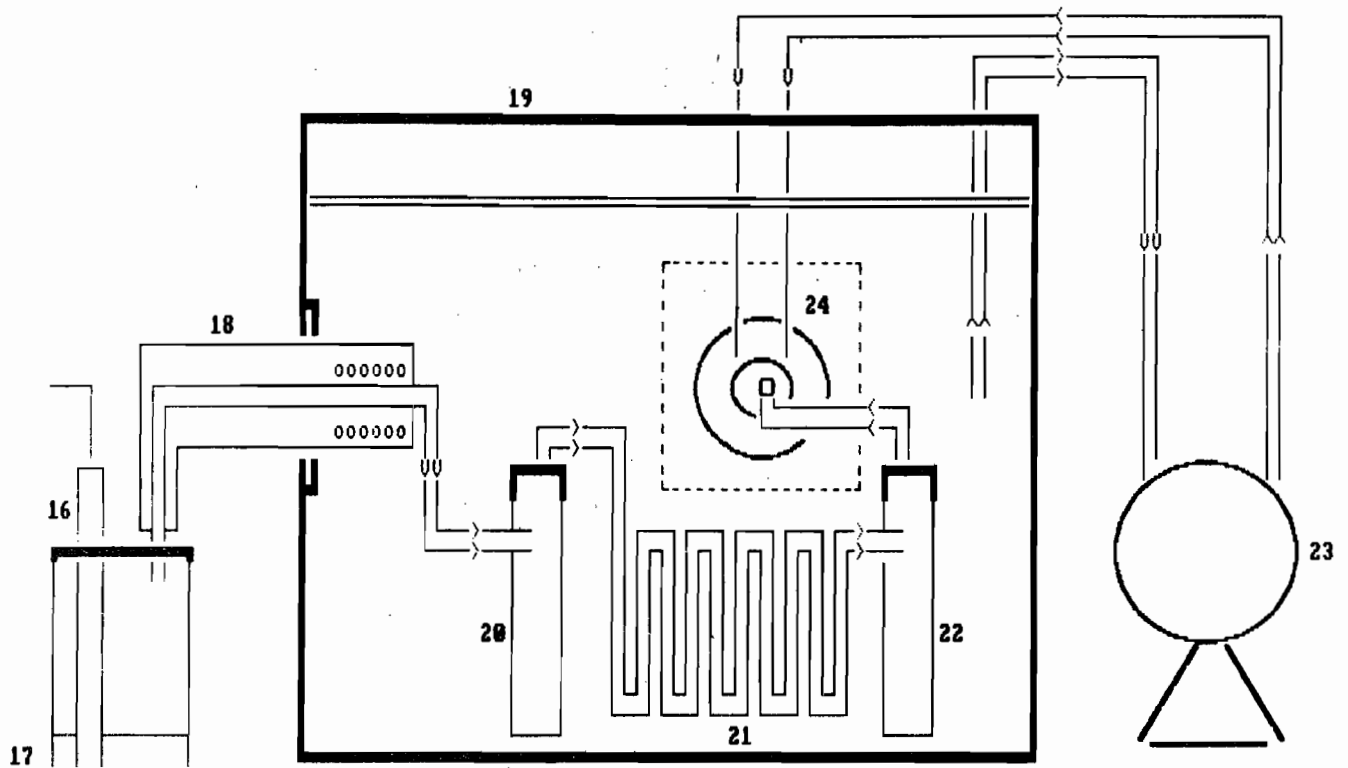


Figura III.1: Panel con los diferentes instrumentos

BAÑO DE TEMPERATURA CTE.



VISTA LATERAL DEL RECUADRO

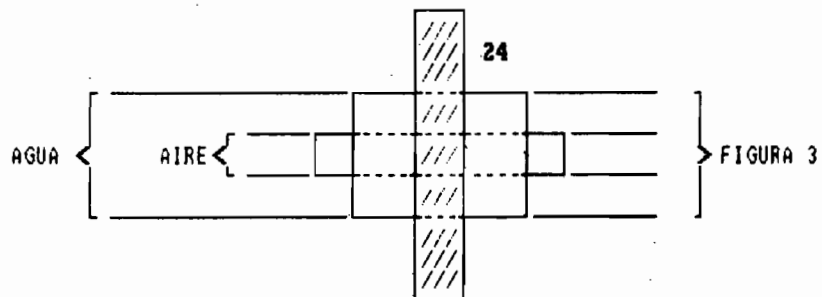


Figura III.2: Sistema de regulacion de temperatura

REACTOR

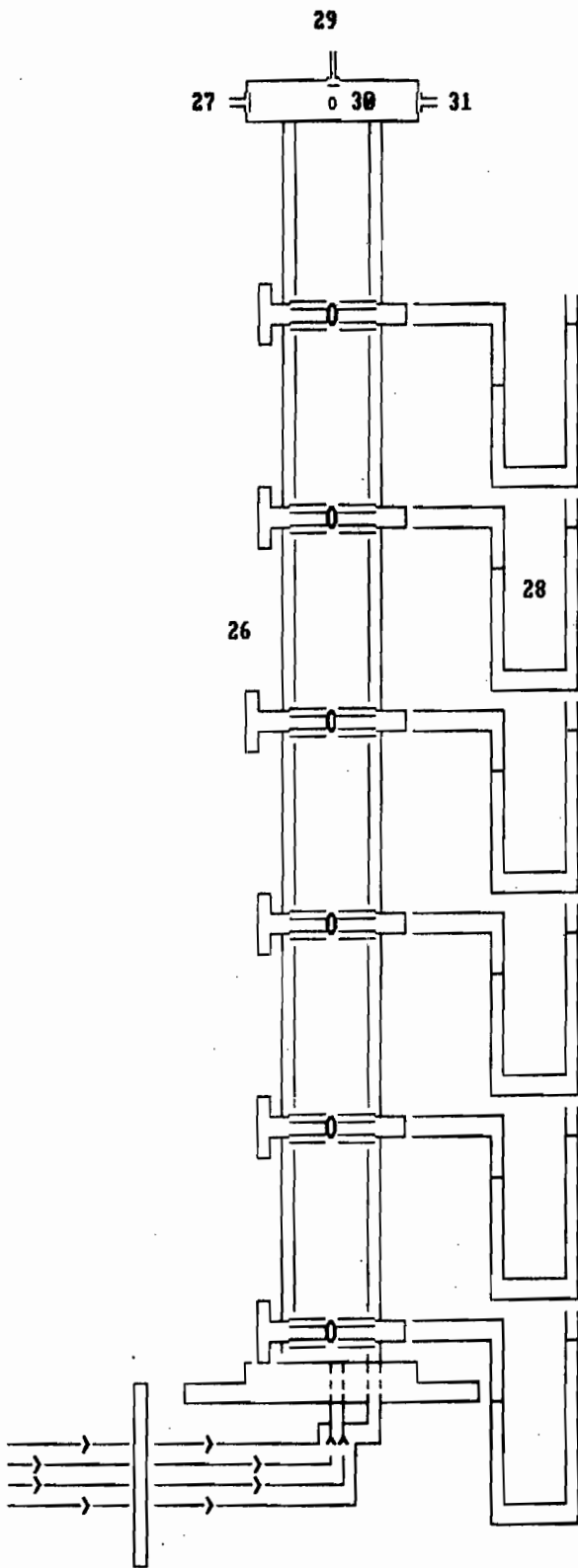


Figura III.3: Reactor para la fermentacion

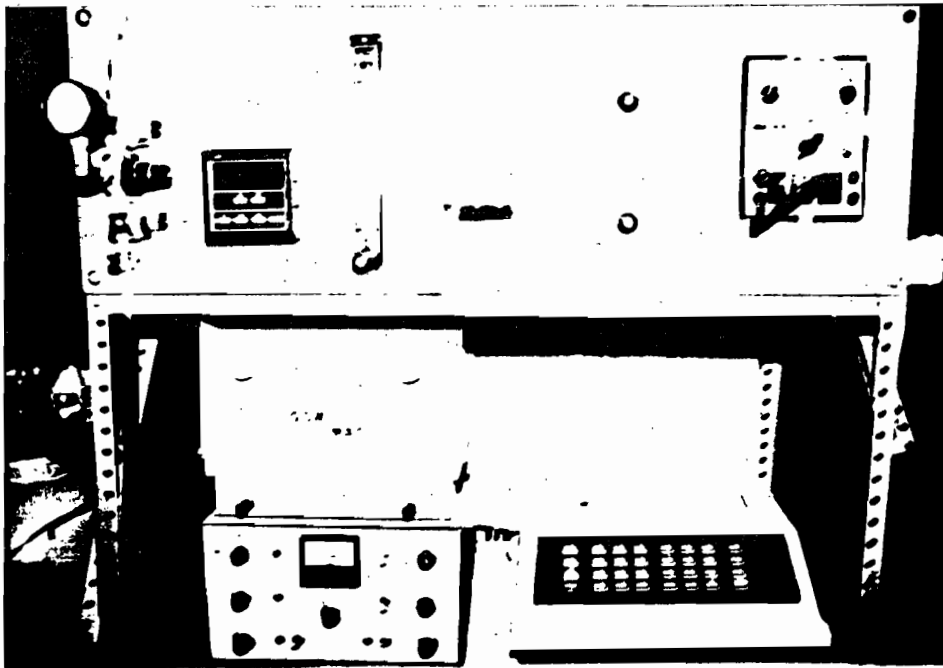
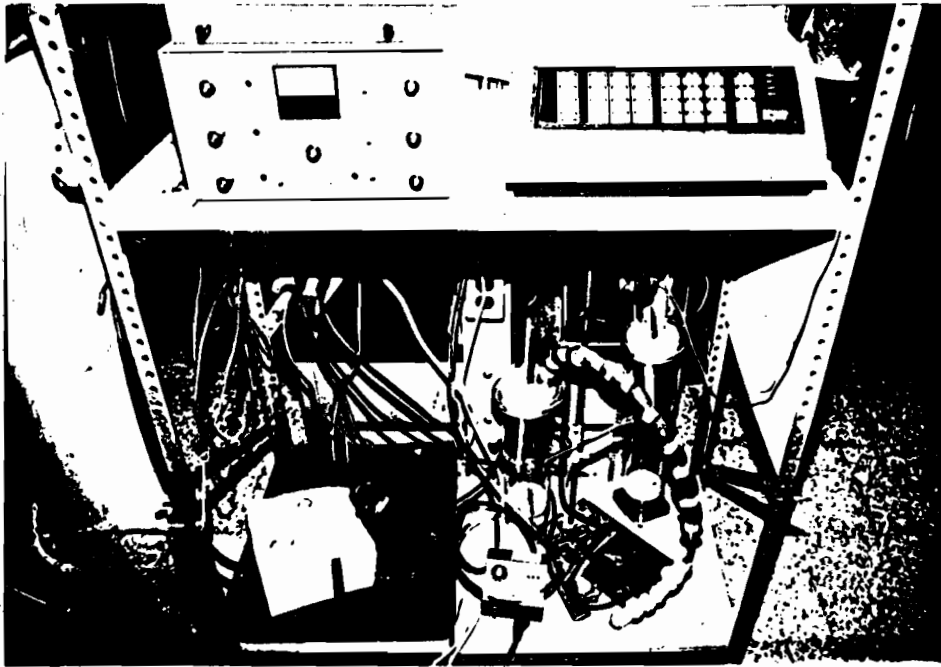


Foto 1: Sistema de medicion

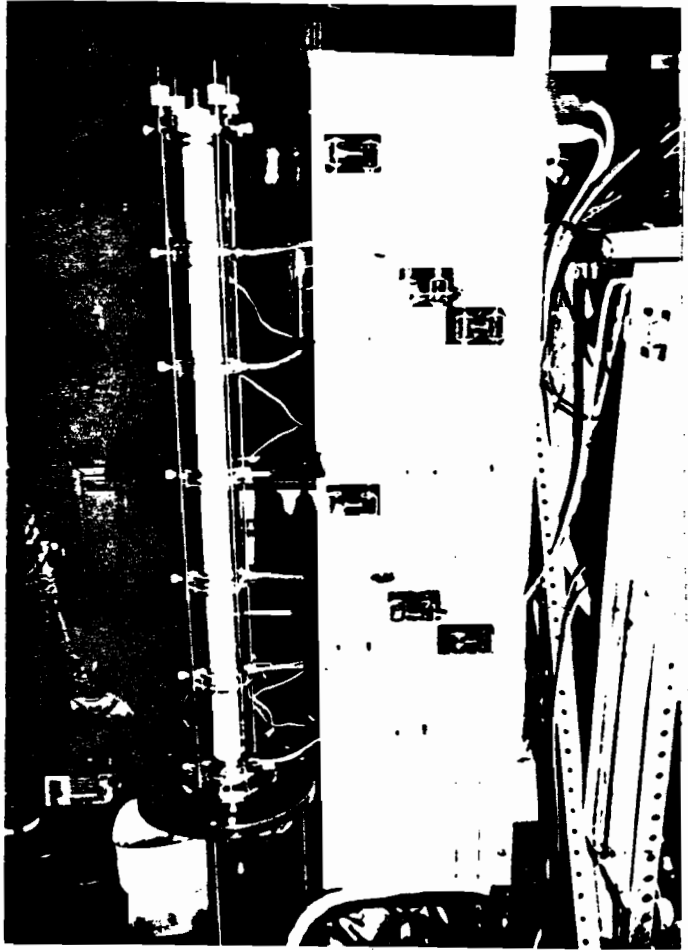


Foto 3: Reactor modular empacado



Foto 2: Modulo de reactor empacado

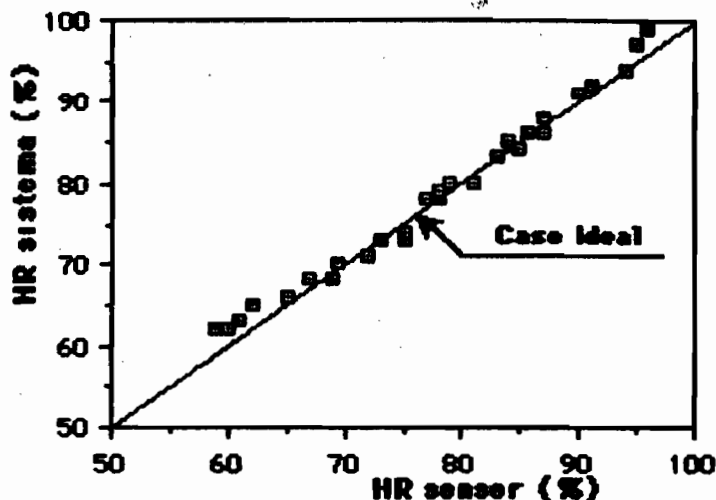


Fig III.4: Comparación entre la humedad relativa del sistema y la humedad relativa del sensor.

4. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- El medio de cultivo es similar a lo descrito en el anexo I (p. 72) solo cambió la concentración de azúcar (2 veces más) conservando un C/N de 12 y la humedad inicial (53 %).

- La temperatura de incubación es de 34 °C

- El flujo de aire de 40 l/hr.

Se midió a cada hora de la fermentación, en los 6 niveles del reactor (dirección Z):

- la concentración de CO₂ y O₂ con jeringas de gas de 100 μl mediante un cromatografo de gases;
- la temperatura;
- la caída de presión;

y en la entrada y salida del reactor la humedad relativa del aire y el flujo.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Presentamos los primeros resultados de un experimento de fermentación en este tipo de reactor. La figura III.5 representa durante la fermentación la variación de la concentración de CO₂ producido a tres niveles del reactor (27.5 cm, 57.5 cm, 82 cm). Se usó para medir el CO₂ un flujo de aire bajo (13.5 l/hr) para evitar una dilución del CO₂ en el aire. Se observa que la producción de CO₂ empieza a las 16 horas en la parte alta del reactor y que no se detecta CO₂ en la parte baja del reactor. El máximo de producción está observado a las 26 horas y alcanza para este flujo de aire un 12 % a la salida del reactor.

Este arranque del CO₂ está bien correlacionado con una subida de la temperatura en los niveles 27.5 cm y 57.5 cm (fig.III.6). Se encuentra también un máximo de temperatura a las 26 horas de la fermentación. La temperatura sube en promedio de 2 °C, la cual corresponde a una mayor actividad metabólica. No se observan gradientes axiales de temperatura, sólo la temperatura es diferente en la entrada y la salida del reactor.

PRODUCCION DE CO2

flujo 13.5 l/hr.

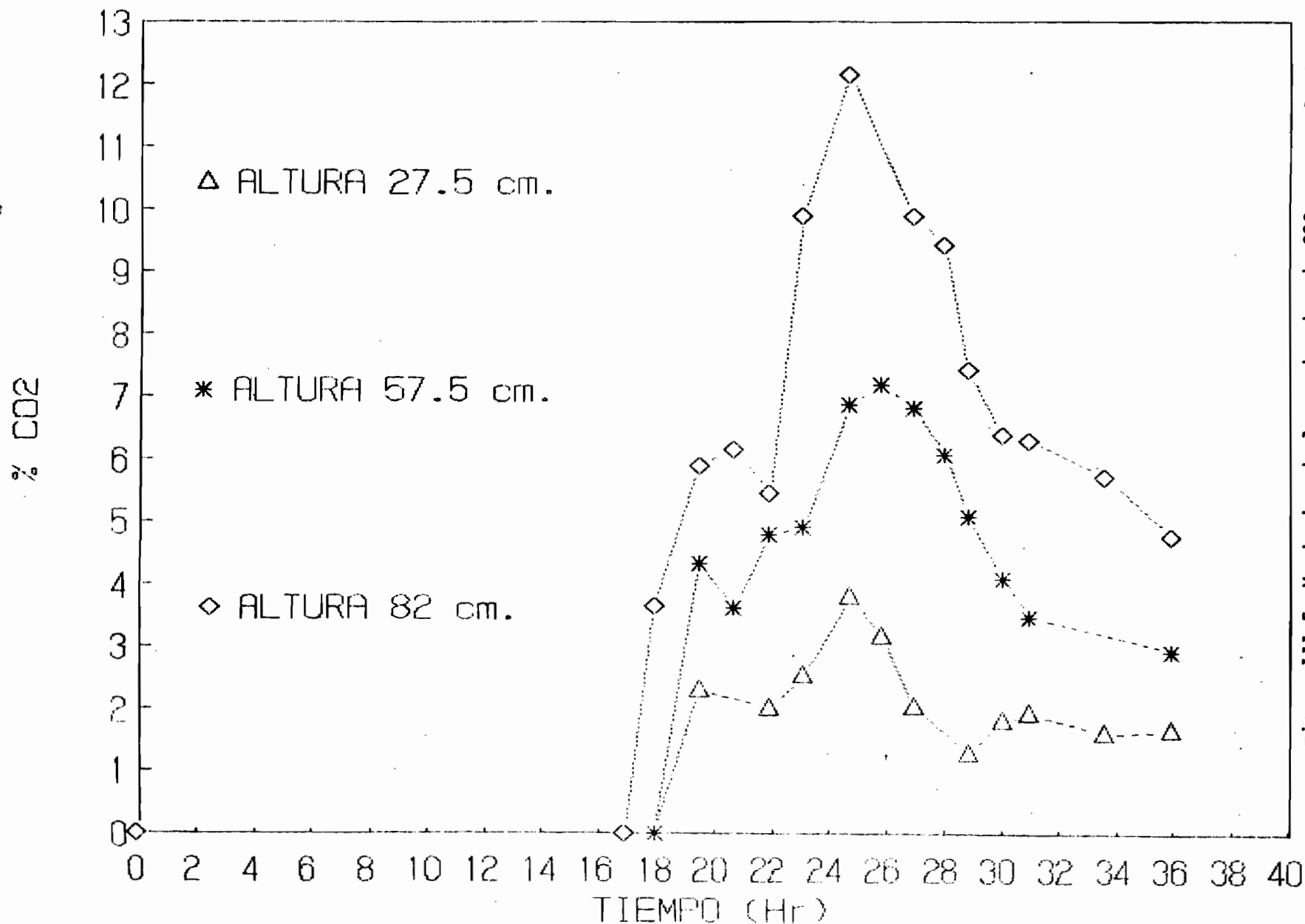


Figura III.5: Variación de la producción de CO2 contra el tiempo para tres alturas del reactor

TEMPERATURA

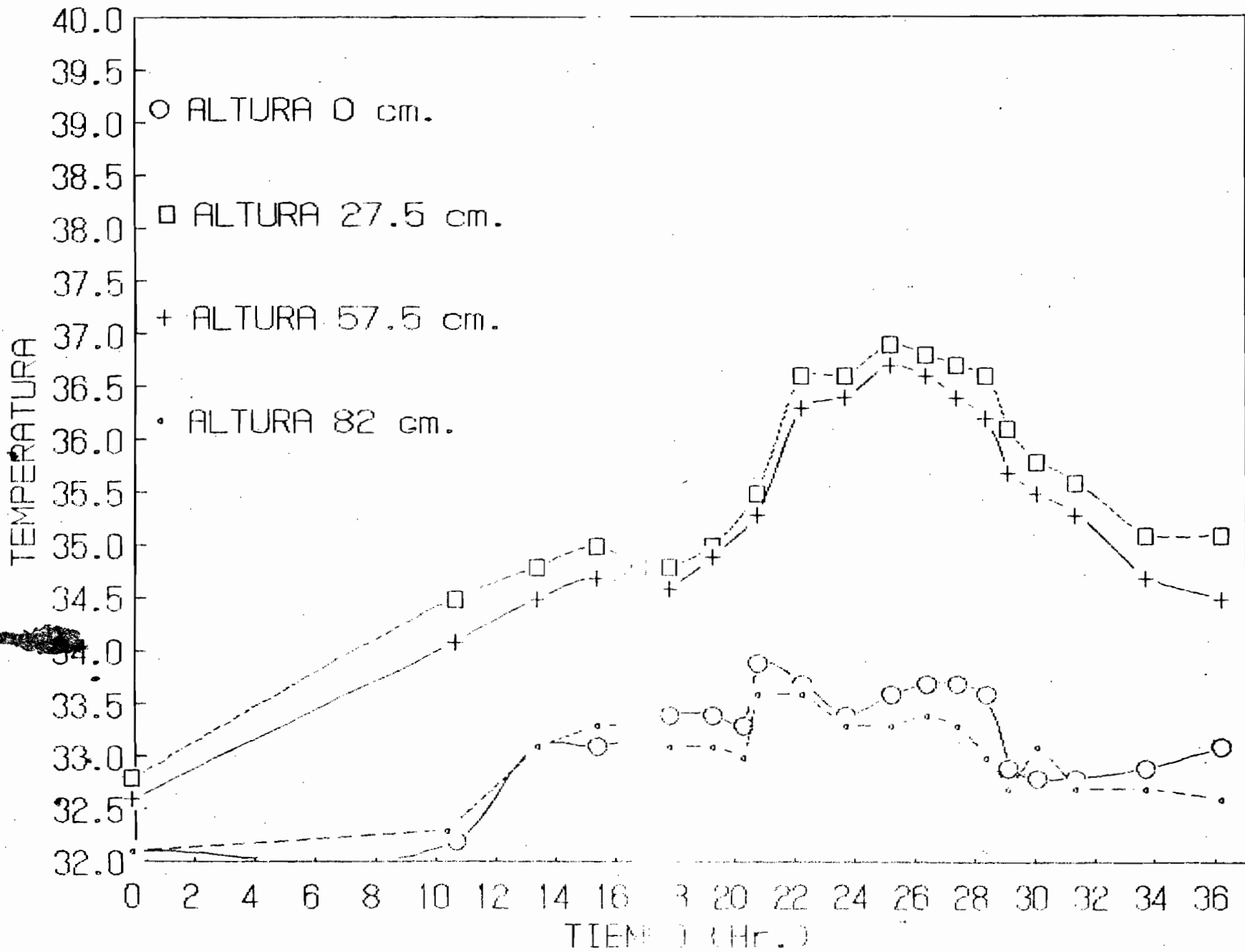


Figura III.6: Variación de la temperatura contra el tiempo para
cuatro alturas del reactor

CAIDA DE CARGA

Flujo 42 Lt/Hr.

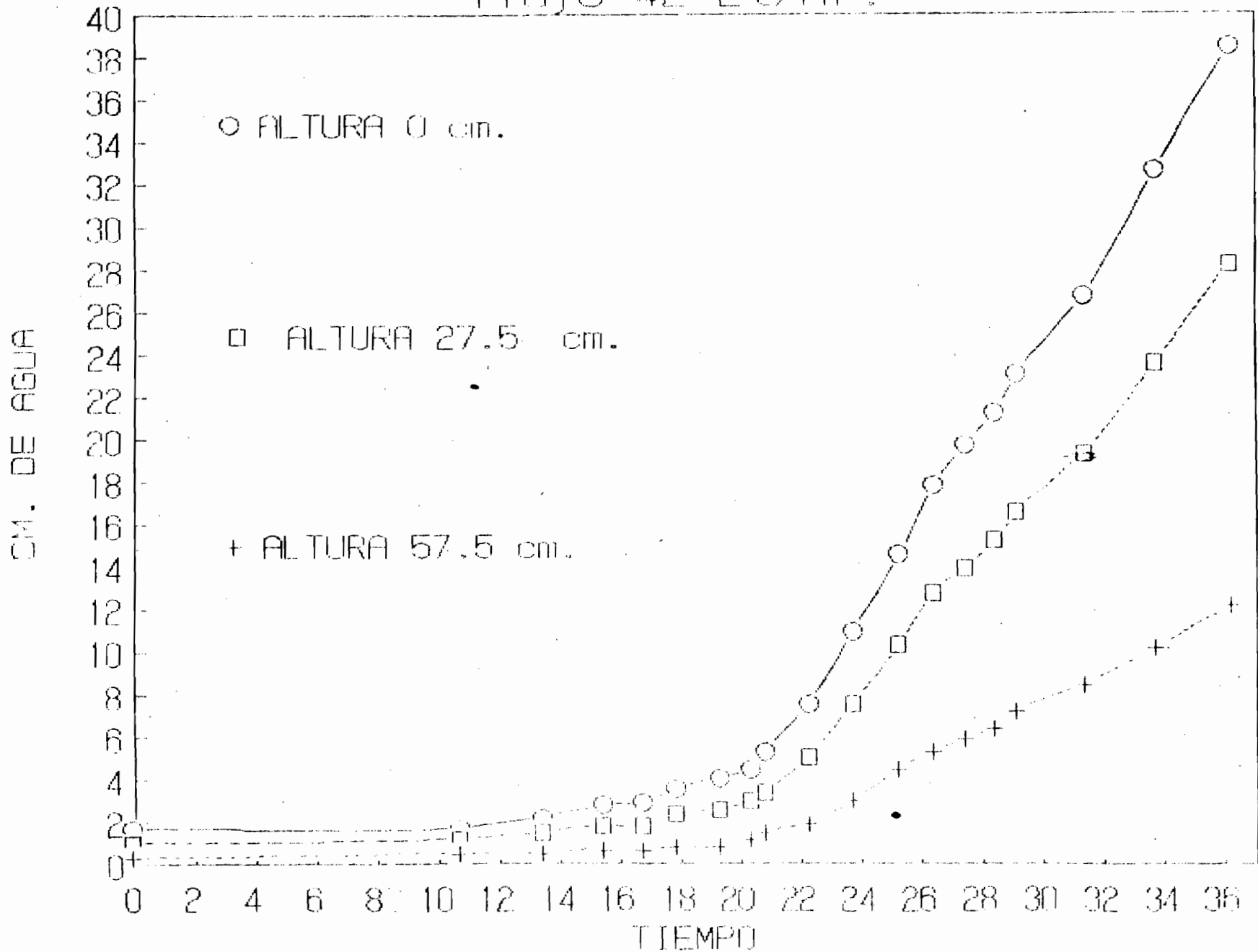


Figura III.7: Variación de la caída de carga contra el tiempo para tres alturas en el reactor

Se presenta en la figura III.7 la variación durante la fermentación de la caída de carga a tres niveles del reactor (0 cm, 57.5 cm, 82 cm). En todos los niveles la caída de carga erranca a las 19 horas, este tiempo es similar al encontrado con el CO_2 y la temperatura. La caída aumenta hasta llegar a las 36 horas un 38 cm de agua. Para el flujo usado (42 l/hr) este valor de caída es bastante alto, no se puede despreciar. Después de las 26 horas, valor que corresponde al máximo de producción de CO_2 , la caída de carga sigue subiendo. El hecho que el CO_2 disminuye no quiere decir que se para el crecimiento de hongo. Sigue creciendo hasta que llegue a la fase de mantenimiento en donde el crecimiento decrece

ANEXO III-2

1. INTRODUCCION

Existen diferentes métodos de cuantificación de biomasa, los cuales tienen diferentes características, ventajas y desventajas. Los métodos de cuantificación de proteína usados lo más frecuentemente son:

- El método de Kjeldhal
- El método de Lowry.

El método de Kjeldhal se basa en la precipitación de las proteínas orgánicas con ácido tricloroacético y su posterior digestión con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador.

Esta determinación es cuantitativa y estima el contenido de proteína total, esto es incluye polipéptidos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados presentes.

El método de Lowry se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Las variaciones en este método pueden deberse al pH, tiempo de reacción, concentración de los reactivos, azúcares y productos celulósicos. En este método el color no es estrictamente proporcional a las concentraciones de las proteínas.

Entre sus ventajas están: se pueden medir el contenido de proteínas en fracciones enzimáticas, se puede medir en mezclas de tejidos con proteínas, mediciones de cantidades muy pequeñas o soluciones diluidas. Las razones por las que no se recomienda usar éste método son: no se puede aplicar a muestras con alto contenido de materiales lignocelulósicos, no se puede aplicar a muestras con fenoles y el rango de linealidad es de 0-300 mg/l.

Existen otros métodos de numeración de mohos como son el de enumeración. Cada espora es capaz de formar una colonia o un talo después de ser inoculado en un medio. El número de colonias corresponde al número de esporas viables presentes en el inóculo. Teniendo en cuenta la dilución, podemos saber la concentración de la muestra. Este último método nos da una idea de la cantidad de microorganismos presentes en una muestra, pero no nos dice su estado de desarrollo.

También se puede medir la biomasa mediante una medida de la concentración de CO_2 o O_2 . Considerando una relación entre la tasa de consumo de oxígeno y la biomasa (Sato y col., 1983) se puede, conociendo el coeficiente de rendimiento (Y_{O_2}) y de mantenimiento (m_{O_2}), deducir la cinética de crecimiento. Sin embargo, para inicializar el modelo se necesita conocer el equivalente en esporas de la biomasa inicial y también los valores de Y_{O_2} y m_{O_2} los cuales pueden ser dependiente de otros parámetros.

2. OBJETIVO

En el anexo I (p. 75 ,fig. 26.1) hemos mostrado que la caída de carga está relacionada con el crecimiento del hongo. El objetivo de este trabajo es tratar de sacar una relación entre la caída de presión y la biomasa. La razón de obtener una correlación entre la biomasa y la presión total de la fase gaseosa es de facilitar el proceso en experimentos de fermentación, eliminando el problema de alteración de las condiciones existentes debido a la extracción de muestras para su análisis y además se podría permitir el monitoreo del proceso a diferentes intervalos de tiempo durante toda la fermentación.

Sabemos que tres parametros puede influir sobre la caída de carga lineica (Ergun, 1952):

- el flujo de aire,
- el diametro mediano de la distribución de las partículas,
- la porosidad del lecho.

En estos tres parametros dos pueden ser considerados como constante durante la fermentación. El flujo de aire, bien controlado mediante una microvalvula y el diametro mediano de la distribución de partículas lo cual se queda constante durante la fermentación (Anexo I, p.81, fig. 26.6, p.82, fig.26.7). Hemos observado (Anexo I, p.79 ,foto 26.1) que el crecimiento del hongo es solamente superficial. En este caso el hongo tapa poco a poco los poros aumentando la caída de presión.

En primer paso estudiaremos la influencia del flujo de aire sobre la cinética de crecimiento. Despues trataremos mediante la ley de DARCY de calcular el coeficiente de permeabilidad gaseosa en función de la biomasa. Este coeficiente de permeabilidad nos debería permitir mediante una medida de caída de carga y del flujo de aire correspondiente de evaluar la biomasa.

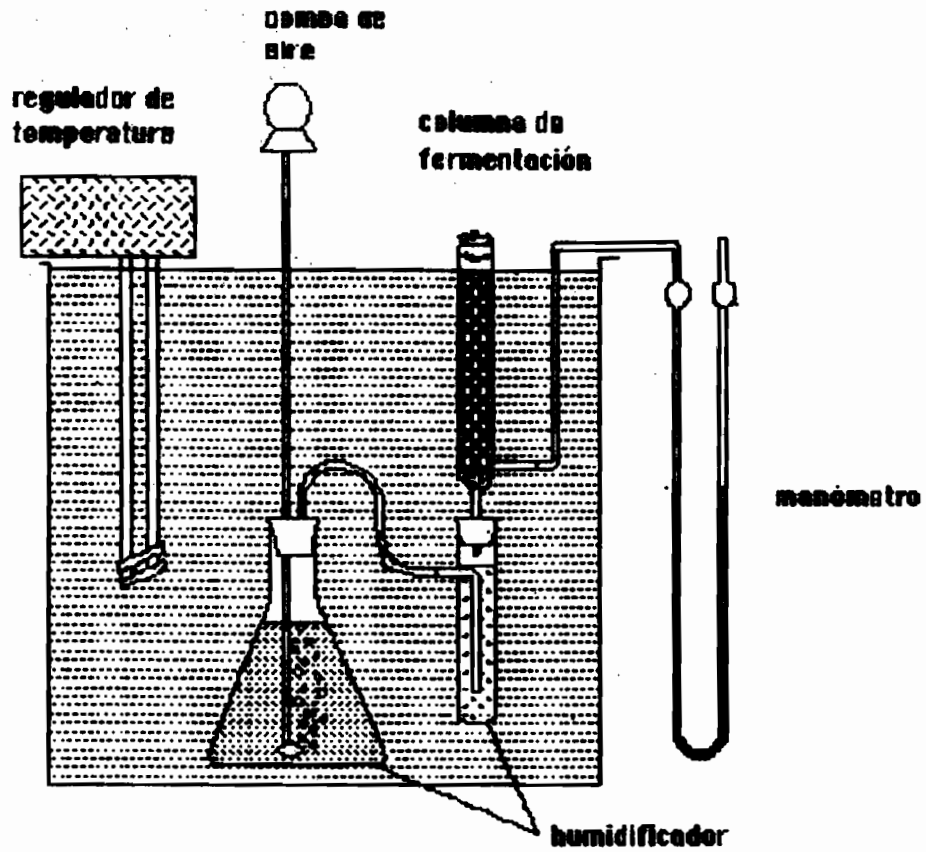


Fig. III.1.a: Dispositivo experimental para la medida de la
de carga.

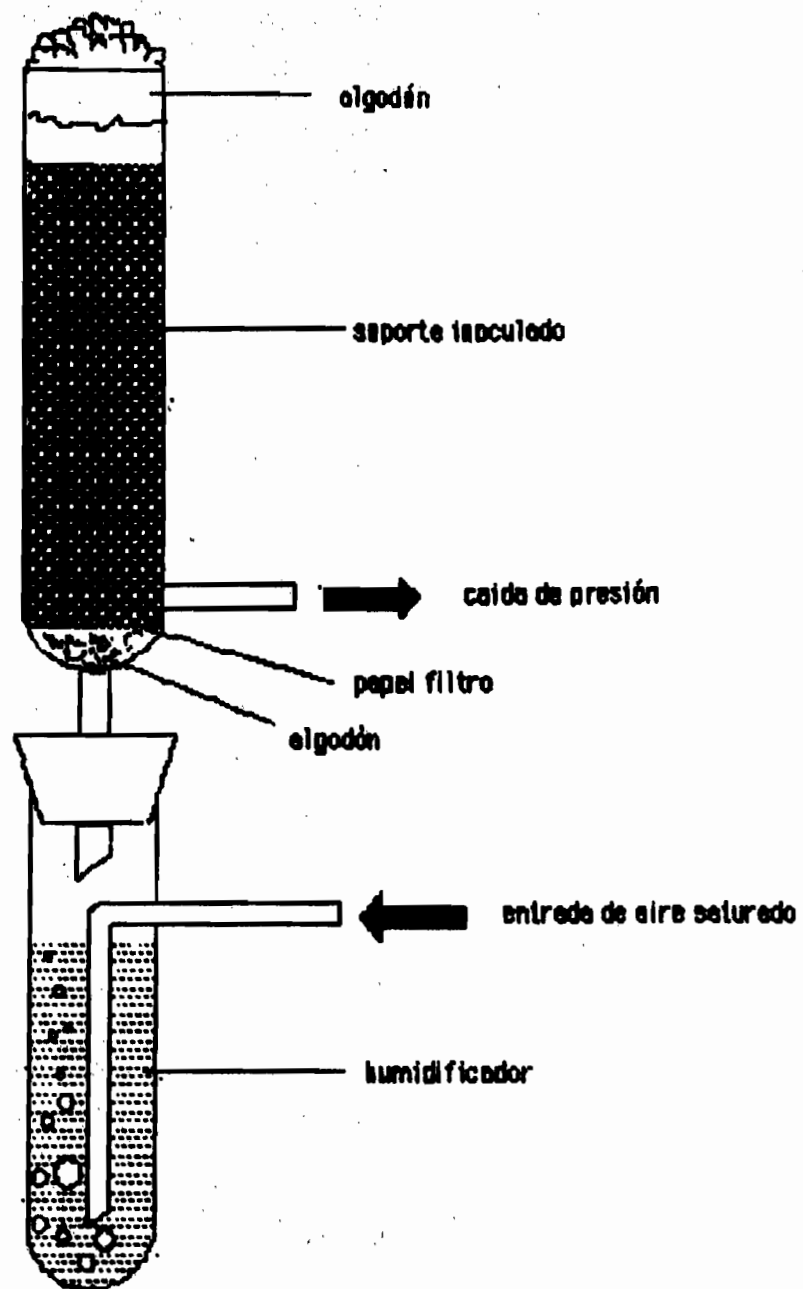


Fig.III.1b: Descripción de la columna de fermentación.

3. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

Se presenta en la figura III.1.a el sistema experimental utilizado para medir la

caída de carga durante una fermentación. El sistema se compone de un baño de agua regulado en temperatura, de un prehumidificador sumergido en el baño y de una columna de fermentación. Para medir la presión total de la fase gaseosa se usa un manómetro de agua en forma de U. Un bombe suministra el aire al prehumidificador, el flujo de aire fue regulado con una microválvula.

Se presenta en la figura III.1 a el sistema de fermentación con su humidificador y su columna de 15 cm de largo y 2 cm de diametro. Disponemos en la parte baja de la columna un algodón y un papel filtro para que el soporte (amberlita IRA-900) impregnado del medio de cultivo no se cae. El lecho empacado tiene una altura de 65 mm y una densidad aparente de empaque de 0.672 g/cm^3 .

Un sistema de pecera (Anexo I, p.64, fig.21.1) nos permitira medir la biomasa a diferentes tiempos durante la fermentación.

4. CONDICIONES EXPERIMENTALES

La preparación del medio de cultivo es similar al estudio preliminar(Anexo I, p.72).

Los flujos de aire usados durante los diferentes experimentos son los siguientes:

2 l/hr, 8 l/hr y 15 l/hr.

La temperatura de incubación es de 35 °C.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Influencia del flujo de aire sobre la cinetica de crecimiento

La figura III.2 representa la evolución de la biomasa contra el tiempo para diferentes valores del flujo de aire. Podemos observar que no existe casi ninguna influencia sobre la cinética de crecimiento para un rango de flujo de aire de 2 a 20 l/hr. La germinación dura entre 10 a 11 h y la fase de mantenimiento empieza a las 21 horas. De estas diferentes curvas se sacó una cinética promediada que consideraremos como representativa de las cineticas establecidas para los diferentes flujos.

5.2 Evolución de la cinetica de crecimiento y de la caída de carga

Se presentan en las figuras III.3, III.4, III.5, III.6 las evoluciones de la biomasa y de la caída de carga para tres flujos diferentes. Se nota entre las dos variables una buena correlación. Durante la fase de germinación (0 a 11 horas) no existe ningún crecimiento del hongo, la caída de carga sigue constante. Después, la caída de carga aumenta siguiendo el crecimiento del hongo. Después de las 21 horas cuando empieza la fase de mantenimiento, la caída de carga sigue constante de conformidad con la biomasa.

5.3 Determinación del coeficiente de permeabilidad gaseosa

Para evaluar el coeficiente de permeabilidad gaseosa usamos la ley de DARCY .
Viene:

$$r V = K. DP/ DZ \quad (4)$$

En donde:

P es la presión de la fase gaseosa medida con el manometro

Z es la altura del lecho poroso
K es el coeficiente relativo de la fase gaseosa
r es la masa volumica del aire
Y es la velocidad del aire

Conociendo el valor de la caída de carga para un flujo dado se puede determinar el coeficiente de permeabilidad relativa que le corresponde y expresar este coeficiente en función de la biomasa medida.

La figura III.7 representa la evolución del coeficiente de permeabilidad en función de la biomasa para diferentes flujos. Observamos que el coeficiente de permeabilidad K disminue de manera importante entre 2 y 3.5 mg de proteínas por gramos de soporte seco. Más allá de 3.5 mg de proteínas/g s.s el coeficiente disminuye menos rapido mostrando que exista para este valor de biomasa un fenomeno particular al nivel del transporte de la fase gaseosa. Muchos trabajos fueron hechos para la determinación del coeficiente de permeabilidad líquida y gaseosa en el caso de los suelos. En el caso del transporte del gas en estos medios porosos, el coeficiente de permeabilidad se acerca del zero para un cierto contenido de agua. Este agua la cual ocupa el espacio interparticula se opone al transporte de la fase gaseosa. En nuestro caso el problema presenta algunas similitudes, el hongo coloniza el espacio interparticula y tapa los poros. El aire encuentra una resistencia y la caída de carga puede aumentar de manera importante en el reactor. En un reactor de 90 cm de altura y de 4 cm de diametro, lo cual corresponde a un carga de 800 g de soporte humedo y para un flujo de 200 l/hr hemos observado al final de una fermentación una caída de presión de 2 metros de agua; la caída inicial siendo unos 12 cm. Este cambio de caída lo cual fue causado solo por el crecimiento del hongo puede a veces botar las mangueras del flujo de aire de entrada. Este tipo de parametro puede ser importante para poder dimensionar de manera adecuada los sistemas de ventilación para este tipo de bioreactores.

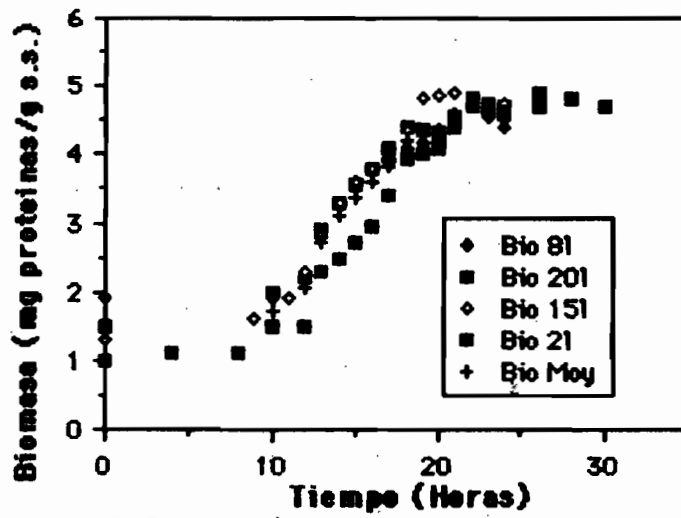


Fig III.2: Variación de la biomasa contra el tiempo para diferentes flujos de aire.

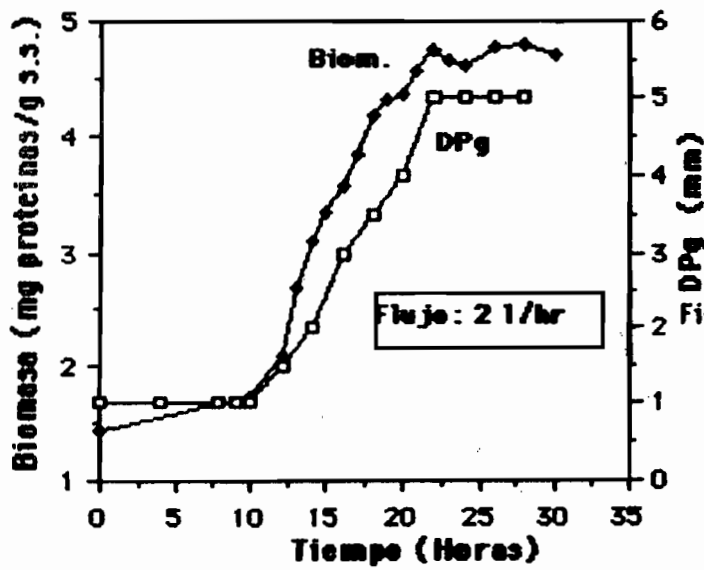


Fig.III.3: Variación de la biomasa y de la caída de carga contra el tiempo para un flujo de 2 l/hr.

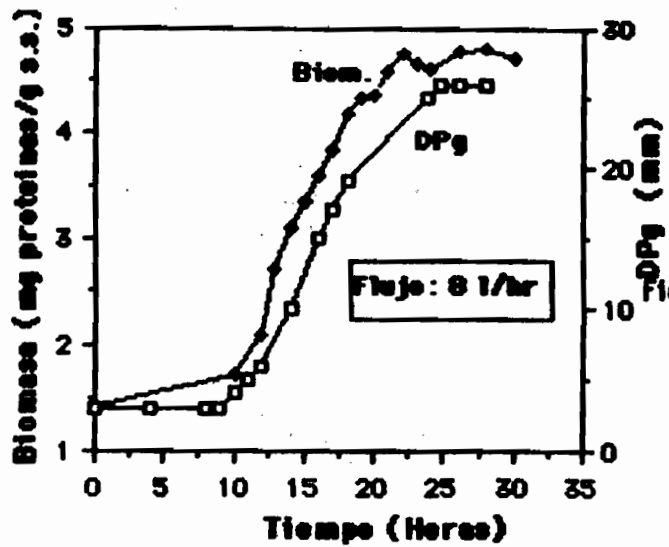


Fig.III.4: Variación de la biomasa y de la caída de carga contra el tiempo para un flujo de 8 l/hr.

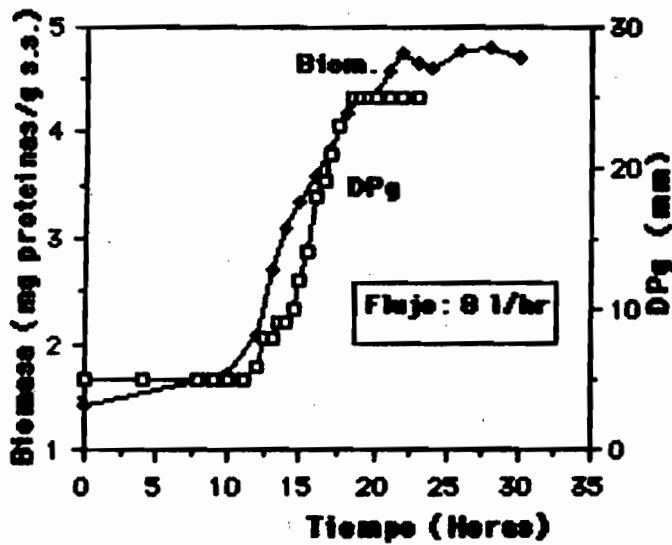


Fig.III.5: Variación de la biomasa y de la caída de carga contra el tiempo para un flujo de 8 l/hr.

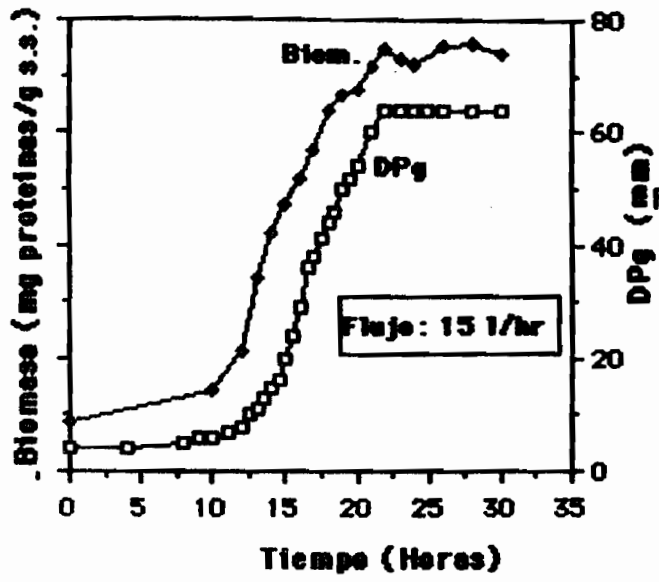


Fig.III.6: Variación de la biomasa y de la caída de carga contra el tiempo para un flujo de 15 l/hr.

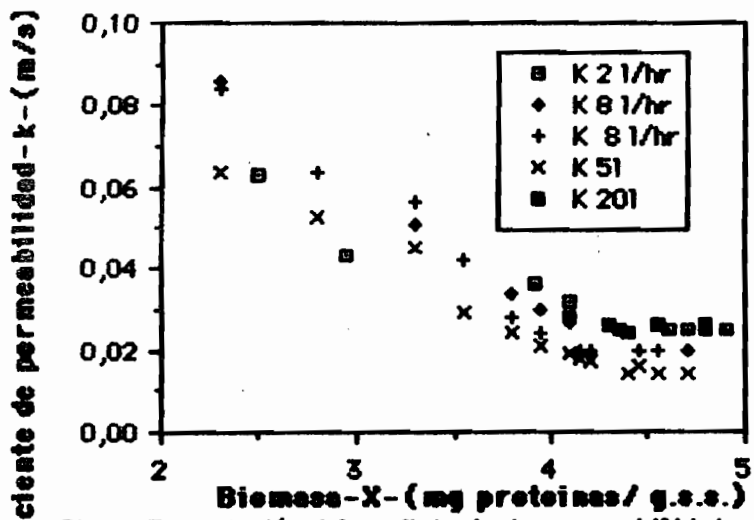


Fig.III.7: Variación del coeficiente de permeabilidad relativa en función de la biomasa.

**ANEXO IV
PROYECTO DE BIOREACTORES PARA
FERMENTACION EN SUSTRATO SOLIDO**

Realizado por: Ing. Rual López Ulibarri
M.C. Mariano Gutiérrez Rojas

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa. Apdo. Postal 55-535. Tel. 686.03.22, ext. 338. Fax.
6.86.89.66.

ANTECEDENTES E INTRODUCCION.

La Fermentación en Sustrato Sólido (FSS) ha sido objeto de interés de diferentes investigadores en el mundo por ser un sistema que presenta importantes ventajas, tales como: manejar bajos volúmenes de materiales, obtención de productos concentrados, utilizar una tecnología relativamente sencilla y la posibilidad de realizar dicho proceso en forma séptica, entre otros (Helsentine, 1972; Cannel y Moo-Young, 1980). Por otro lado, presenta algunas dificultades como la utilización de una gran cantidad de mano de obra, la necesidad de pretratar la materia prima y el manejo de un material heterogéneo en el fermentador (Raimbault, 1980; Moo-Young et al., 1983), en donde la actividad de agua desempeña un papel muy importante (Oriol et al., 1988a).

Estos temas han sido estudiados por diferentes investigadores lo que ha producido una serie de diseños de fermentadores para FSS con diferentes enfoques (Lonsane et al., 1985), entre los que destaca la naturaleza heterogénea del material a transformar..

La heterogeneidad del medio de cultivo en un fermentador para sustratos sólidos, en donde la transferencia de calor y masa son los factores limitantes, es uno de los principales problemas que presenta éste tipo de procesos, y se ha tratado de resolver utilizando :

- a. lechos pequeños en charolas, en donde la altura del lecho apenas alcanza los 5.0-6.0 cm;
- b. columnas empacadas con un diámetro inferior a 10.0 cm e inmersas en baños de temperatura controlada y
- c. mezclando el medio de cultivo en forma intermitente o continua.

El tipo de FSS (estática o dinámica) está directamente relacionada con las características reológicas del medio de cultivo. De los diferentes materiales que se utilizan en estos cultivos, los de alto contenido de carbohidratos como los tubérculos, al prepararse y mezclarse (López-Ulibarri et al, 1989), forman aglomerados que difícilmente pueden separarse provocando una baja en la eficiencia del transporte de masa y energía. Otros materiales con un alto contenido de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, etc.), pueden prepararse para un proceso de FSS y someterse a un mezclado, que usualmente debe ser suave (1-5 rpm), con lo cual se logran reducir los gradientes del medio de fermentación, favoreciendo la transferencia de masa y energía.

En general, los fermentadores para FSS se pueden clasificar, por el movimiento del material a transformar en:

- a. **estáticos**, que son aquellos en donde se coloca el material a fermentar con una densidad de empaque predeterminada y permanece **sin movimiento** a lo largo del proceso de fermentación. y
- b. **dinámicos**. Que son aquellos en los que se coloca el material a fermentar poco a poco, en un proceso continuo o semicontinuo (Gibbons et al., 1986), o en una sola etapa, en un proceso por lotes (Huerta-Ochoa et al., 1986) y que durante el proceso el material se mezcla, con movimientos usualmente suaves (1-5 rpm) en pulsos o en continuo.

Existen otros tipos de bioreactores para FSS que no pueden ser clasificados como dinámicos estrictamente, debido a que el movimiento del material a fermentar no es de tipo mecánico, estos son los lechos fluidizados con aire (Hong et al., 1989) o líquido (Adisasmith et al., 1987).

El concepto convencional de FSS implica la utilización del material sólido como sustrato (almidón, glucosa, celulosa, hemicelulosa, etc) y además como soporte físico de los microorganismos (hongos y levaduras, principalmente) para lograr la biotransformación deseada. Sin embargo, existe un concepto diferente de FSS en el cual se utiliza un medio de cultivo "sintético" absorbido en un soporte que por sus características se supone inerte (fibras, plásticos, ect.). A estos procesos se les conoce como Fermentación en Sustratos Adsorbidos (FSA) (Oriol, et al, 1988b) y se utilizan en donde se requiere un control preciso del medio de cultivo y evitar así perturbaciones posibles debido a la heterogeneidad del material. La investigación de estos procesos usualmente se ha llevado a cabo utilizando reactores de lechos empacados (Huerta, et al 1990).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Se revisaron las publicaciones mas recientes sobre biorreactores para la FSS y se analizó el tipo de biorreactor relacionado tanto con el sustrato como con el microorganismo utilizados, haciendo notas de las características principales del mismo. Esta información se estructuró en una base de datos y el listado se presenta al final de este anexo.

OBJETIVO Y DEFINICION DEL TRABAJO.

El presente trabajo consiste en diseñar y/o seleccionar un prototipo de biorreactor para FSS a nivel laboratorio (2.0 a 3.0 litros de volumen de operación) con el cual sea posible investigar aspectos de ingeniería particulares y poder resolver algunos problemas que se han presentado en el escalamiento en trabajos realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación (Gutiérrez-Rojas et al, 1989). El diseño final del prototipo contemplará un alto grado de instrumentación y se acondicionará

para estudiar los siguientes aspectos de los procesos de FSS:

1. Cinéticas de producción de biomasa y metabolitos, evaluando los sistemas de control de temperatura y aereación, así como los instrumentos de medición en general.
2. Determinación y evaluación de los parámetros de escalamiento mas relevantes, esto es, el establecimiento de los coeficientes de transferencia de masa y energía en el control del proceso.
3. Análisis de la eficiencia de agitación y el mezclado y su relación con la transferencia de calor y masa, como un sistema análogo a los reactores catalíticos heterogéneos.
4. Aplicación de la teoría de control de reactores.

JUSTIFICACION A LAS BASES DE DISEÑO DEL PROTOTIPO DE FSS.

Uno de los problemas más grandes que presentan las FFS es la deficiente transferencia de calor y masa, lo que provoca considerables gradientes de temperatura (Saucedo et al, 1990) y de gases; una manera de disminuir estos gradientes es mezclando. Los sistemas dinámicos, de acuerdo a la bibliografía consultada, se han empleado para la producción de biomasa (Baldensperger et al, 1985; Durand y Chereau, 1988) y metabolitos como etanol (Gibbons et al 1986 y Sato et al, 1988) y enzimas (Deschamps et al, 1985), en donde la reología del sustrato provoca un mezclado ineficiente y el esfuerzo cortante puede propiciar ruptura celular. Sin embargo, con el estudio de sistemas de mezclado suave, se puede lograr aumentar la eficiencia del proceso sin daño a las estructuras celulares. Este mezclado puede ser continuo o discontinuo.

Por otro lado, para obtener un medio ambiente adecuado para los microorganismos en procesos de FSS, es necesario proveerlos de la temperatura y la humedad determinadas como óptimas o lo mas cercano posible a ellas, lo que induce por un lado, al diseño de un sistema de control de temperatura del medio sólido y por otro, al control de temperatura y humedad del aire de proceso para FSS aeróbias.

Estudios sobre transferencia de calor, han demostrado que el proceso de transferencia convectiva de calor es mucho mas importante que el de transferencia conductiva (Saucedo-Castafeda et al 1990), por lo que se puede afirmar que el control de temperatura del proceso se realiza principalmente por dos vías: con el aire de proceso y con el mezclado. Desde este punto de vista, el aire utilizado en el proceso tiene dos objetivos: proveer de un ambiente aeróbico al medio de fermentación y controlar la temperatura del medio.

En un principio, el aire de proceso se utiliza para calentar el medio a la temperatura adecuada y posteriormente se utiliza para evitar el sobrecalentamiento debido al calor metabólico generado durante la fermentación.

En procesos de FSS anaeróbios, la temperatura del proceso se debe controlar en forma indirecta por medio de intercambiadores de calor internos o por chaqueta, lo que aumenta la dificultad del control.

El manejo de materiales sólidos o semisólidos de FFS presenta mas dificultad comparándolo con el manejo de líquidos, como en las fermentaciones sumergidas tradicionales, lo que origina la necesidad de diseñar un biorreactor para FFS donde la manipulación de sólidos y líquidos sea mínima y de forma accesible. Esto implica que en la carga y descarga del biorreactor se utilice la mínima energía posible y en el menor tiempo, lo que se puede lograr utilizando disposiciones geométricas en donde la fuerza de gravedad actúe favorablemente para dicha operación.

El desarrollo del proceso de fermentación es la respuesta efectiva del sistema y solo se puede evaluar determinando el consumo del sustrato, el incremento de biomasa, la evolución del CO_2 , el comportamiento de pH, el comportamiento de la humedad del medio sólido y la aparición de producto (si lo hay), entre otros, y que dependen directamente del diseño del sistema completo, por lo que un sistema de muestreo de material sólido y de gases de manera sencilla es de suma importancia.

Para disminuir los problemas de preparación del medio de cultivo, se debe incluir en el diseño del biorreactor un dispositivo para la adición de líquidos al interior del mismo, el cual puede permitir la adición de agua, sales minerales en solución, inóculo, precursores, etc., al inicio o durante el proceso.

También es importante poder realizar una supervisión visual del material dentro del biorreactor durante el proceso, pues se puede determinar por ejemplo, el desarrollo de una coloración o un deficiente mezclado.

Por lo tanto, el diseño final del prototipo de FFS para laboratorio motivo del presente trabajo, debe contemplar:

- > Sistema dinámico de velocidad regulable y mezclado eficiente.
- > Sistemas de calefacción y enfriamiento eficientes.
- > Sistema de fácil carga y descarga
- > Posibilidad de muestreo periódico.
- > Sistema de adición de sustratos y nutrientes líquidos.
- > Posibilidad de revisión visual interna durante el proceso.

El diseño debe contemplar la implementación de la siguiente instrumentación:

- > Sensores de temperatura del medio.
- > Sensores de temperatura y humedad del aire de proceso.
- > Sensores de flujo de aire de proceso (entrada/salida).
- > Sensores para CO_2 y O_2 a la salida del reactor.

El sistema de fermentación final deberá permitir controlar:

- > La temperatura del medio sólido.
- > La temperatura y humedad del aire de proceso.
- > La velocidad de mezclado y su periodicidad.
- > La adición de agua y o nutrientes al medio.
- > La aereación (flujo de aire).

Para lograr los objetivos de diseño señalados, es necesario determinar los equipos periféricos necesarios que componen el sistema de fermentación, el mínimo requerido es el siguiente:

- > Sistema de acondicionamiento de aire filtrado (aire saturado a la temperatura de proceso y aire seco).
- > Indicador/controlador de temperatura del proceso.
- > Indicadores de temperaturas puntuales dentro del fermentador.
- > Válvulas eléctricas actuadoras (solenoides) para control del aire.
- > Motor de velocidad regulable.
- > Interfase para captura de datos en línea por computadora. (Opcional).
- > Multiplexor para captura de datos en línea multicanal (Opcional).
- > Computadora para la captura/proceso de datos en línea (Opcional).

Prototipos seleccionados.

Con base en el estudio realizado de los diferentes fermentadores utilizados en FSS, se señalan tres diseños como los adecuados para ser estudiados a nivel laboratorio (2 - 3 litros de volumen de operación), y que consisten en diseños basados en equipos existentes para el mezclado de sólidos (Perry, 1983) identificados como:

1. Tambor rotatorio. (Fig. 1)
2. Mezclador de sólidos de cascos gemelos, o en V. (Fig. 2)
3. Mezclador de sólidos de gusano vertical. (Fig. 3)

El diseño de estos prototipos incluye todos los sistemas antes mencionados y se esquematizan en las figuras especificadas. Aunque todos estos equipos cumplen en teoría con los requisitos establecidos, existen parámetros que solamente pueden ser evaluados por experimentación, como: volumen máximo de operación, consumo de energía, tiempos de mezclado, etc.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en el análisis bibliográfico y en la aplicación de diferentes experiencias en trabajos de investigación anteriores, es posible afirmar que: a. los equipos señalados tienen las características necesarias para ser utilizados como prototipos de investigación de laboratorio y b. la experimentación con estos equipos, servirá para establecer los parámetros de selección al compararlos en términos de eficiencia y productividad. Se recomienda construir el prototipo señalado como número uno, el tambor rotatorio, por ser el que presenta un diseño más versátil y susceptible de adaptarse a las necesidades antes descritas. Posteriormente se podrá analizar la posibilidad de construir los dos restantes.

BIBLIOGRAFIA

- Adisasmito S., Mihaltz P., Karim M.N. & Tengerdy R.P. 1987. Preparation of Fungal Starter Culture in Liquid Fluidized Bed Reactor. *Biotechnol. Techniques* Vol 1, No. 3: 175-180.
- Baldensperger J., J. Le Mer, L. Hannibal & P.J. Quinto. 1985. Solid State Fermentation of Banana Wastes. *Biotechnol. Letters*. Vol. 7 No. 10: 743-748.
- Cannel E. & Moo-Young. 1980. Solid-State Fermentation Systems. *Process Biochem.* Jun/Jul and Aug/Sep.: 24-28.
- Deschamps F., C. Giuliano, M. Asther, M. C. Huet & S. Roussos. 1985. Cellulase Production by Trichoderma harzianum in Static and Mixed Solid-State Fermentation Reactors Under Nonaseptic Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XXVII: 1385-1388.
- Durand A. & D. Chereau. 1988. A New Pilot Reactor for Solid-State Fermentation: Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 31: 476-486.
- Gutiérrez-Rojas, M., S. Huerta, R. López U., G. Saucedo, E. Favela y G. Viniégra-González. 1989. Solid State Fermentations: Scaling-up, Prototypes and Strategies. En *Applications des fermentations en milieu solide a la valorization des produits agricoles* (M. Raimbault, Editor), ORSTOM Montpellier Francia, pags. 40-46.
- Gibbons W.R., Westby C.A. & Dobbs T.L. 1986. Intermediate-Scale, Semicontinuous Solid-Phase Fermentation Process for Production of Fuel Ethanol from Sweet Sorghum. *Appl. Environm. Microbiol.*, Jan.: 115-122.
- Hesseltine C.W. (1972). Solid State Fermentation. *Biotechnol. & Bioeng.*, 14:517.
- Hong K, Park D., Tanner R., Malaney G.W. & Danzo B.J. 1989. Protein entrainment during baker's yeast fermentation on a semi-solid substrate in air-fluidized bed fermentor. *Bioprocess Engineer.* 4: 209-215.
- Huerta-Ochoa, S., M. Gutiérrez, R. López, A. E. Massucco y G. Viniégra. 1986. Caracterización Técnica de un Fermentador Dinámico para Sustratos Sólidos en Planta Piloto. *Revista de la Academia Nacional de Ingeniería, México.* Vol. 5 No. 2: 46-53.
- Huerta-Ochoa, S., E. Favela, R. López-Ulibarri, A. Fonseca, G. Viniégra & M. Gutiérrez-Rojas. 1990. Absorbed substrate fermentation for pectinase production with Aspergillus niger using a static pilot plant bioreactor. *J. Ferment. Technology* (Enviado para publicación).
- Lonsane B.K., N. P. Ghildyal, S. Budiartman & J. Ramakrishna. 1985. Engineering Aspects of Solids State Fermentation, *Enz. Microb. Technol.*, 7:258.

López Ulibarri, R., S. Huerta, B. Schettino & M. Gutiérrez-Rojas. 1989. Gelatinization of Cassava Meal For Solid State Fermentation. *J. Food. Eng.* 9: 237-243.

Moo-Young M.A., R. Moreira and R.P. Tengerdy. (1983) Principles of solid substrate fermentation, in the filamentous fungi. *Fungal technology*. Vol. IV. S.E. Smith, D.R. Berry and B. Vristiensen, Editors. Arnold, London, PP. 117-144.

Oriol, E., M. Raimbault, S. Roussos & G. Viniestra-González. 1988a. Water and Water Activity in the Solid State Fermentation of Cassava starch by Aspergillus niger. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:498-503.

Oriol, E., B. Schettino, G. Viniestra-González & M. Raimbault. 1988b. Solid State Culture of Aspergillus on support. *J. Ferment. Technol.* 66:1-6.

Perry, R. H. 1983. *Biblioteca del Ingeniero Químico*. 5a. ed. Vol. V. Ed. McGraww-Hill.

Raimbault, M. 1980. Fermentation en Milieu Solide: Croissance des Champignons Filamenteux sur Sustrate Amilace. Tesis Doctoral, U. Paul Sabatier, Francia.

Sato K., Miyazaki S., Matsumoto N., Yoshizawa & Nakamura K. 1988. Pilot-Scale Solid-State Ethanol Fermentation by Inert Gas Circulation Using Moderately Thermophilic Yeast. *J.Ferment.Technol.*, Vol. 66, No. 2, 173-180.

Saucedo-Castañeda G., M. Gutiérrez-Rojas, G. Bacquet, M. Raimbault & G. Viniestra-González. 1990. Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 35: 802-808.

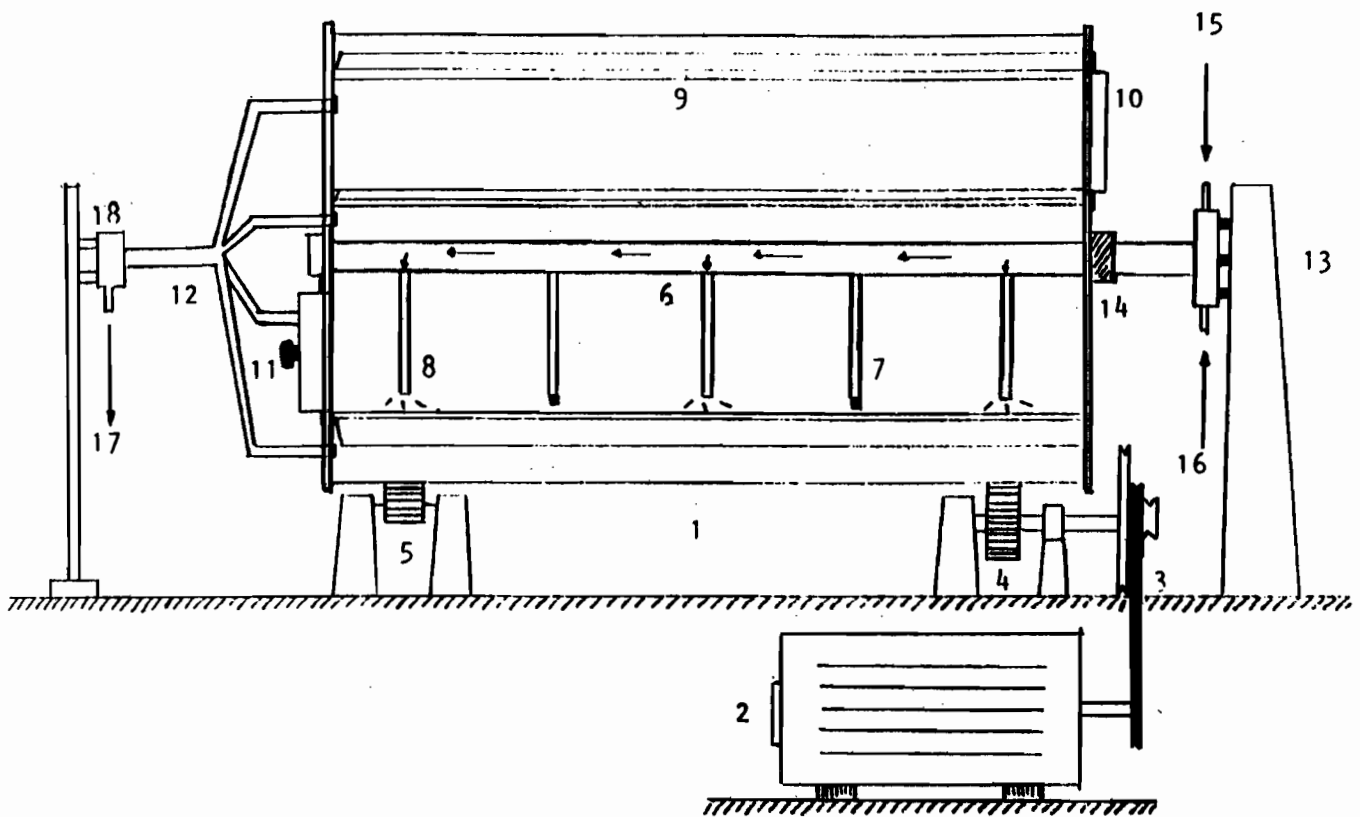


FIGURA 1. Esquema del Prototipo I, Fermentador para Sustratos Sólidos tipo Tambor Rotatorio. 1. Cuerpo del Fermentador. 2. Motor. 3. Sistema de reducción de velocidad de giro. 4. Propulsor. 5. Soporte con rodamiento. 6. Conducto distribuidor de flúidos. 7. Sensores de Temperatura (2). 8. Aspersores (3). 9. Bafles a 90°. 10. Mirilla. 11. Sistema para toma de muestra. 12. Sistema de muestreo de aire en continuo. 13. Soporte del conducto - distribuidor de flúidos. 14. Sello hermético fijo a la tapa. 15. Entrada de aire. 16. Entrada de líquidos. 17. Salida de gases. 18. Sello hermético fijo con salida.

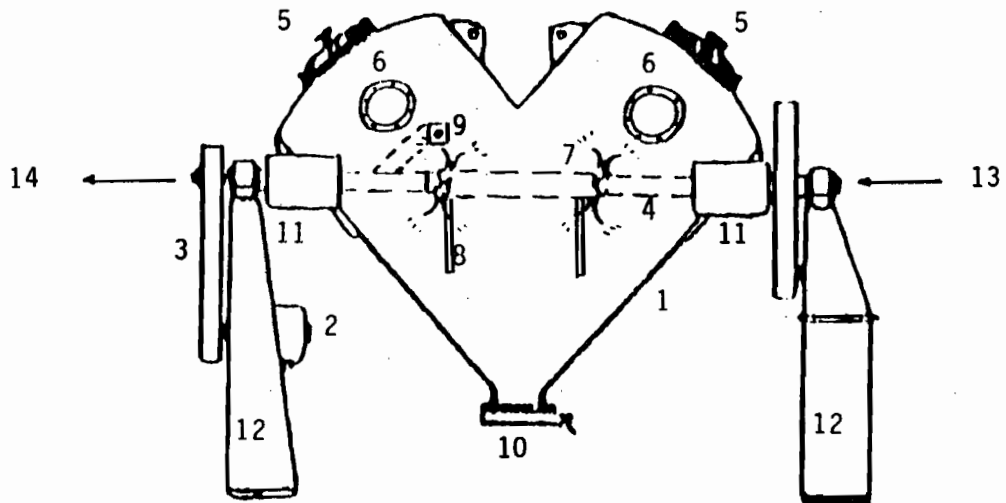


FIGURA 2. Esquema del Prototipo II. Fermentador para Sustratos Sólidos tipo cascos gemélos o en 'V'. 1. Cuerpo del fermentador. 2. Motor. 3. Sistema de reducción de velocidad de giro. 4. Conducto distribuidor de fluidos. 5. Entradas para carga del material. 6. Mirilla. 7. Aspersores. 8. Sensores. 9. Sistema para muestreo de aire. --- 10. Descarga del material y toma de muestras. 11. Sellos herméticos. 12. Soportes del cuerpo. 13. Entrada de fluidos. 14. Salida de gases.

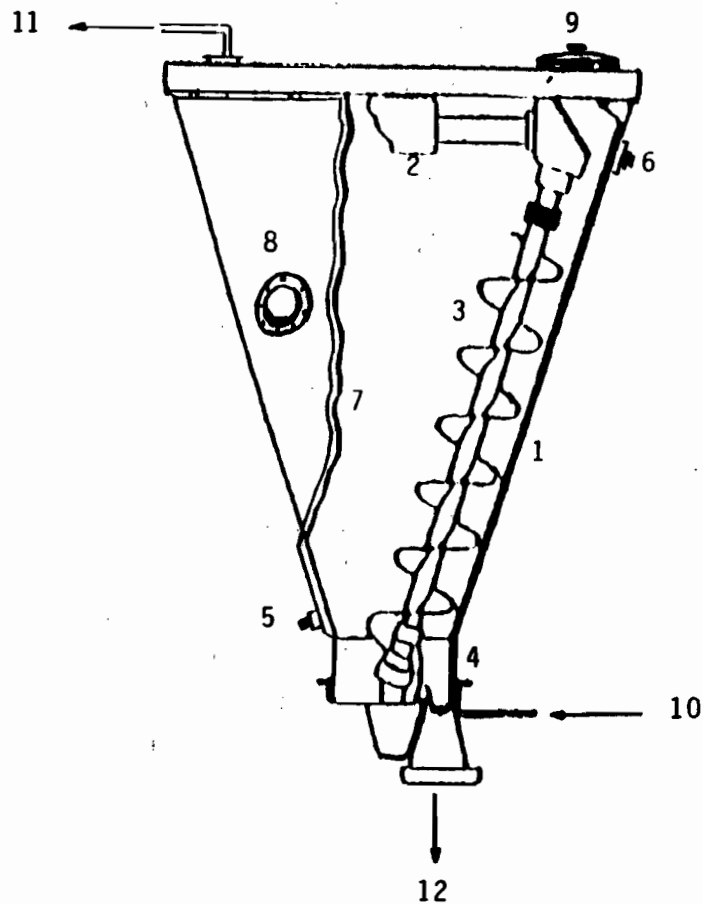


FIGURA 3. Esquema del Prototipo III. Fermentador para Sustratos Sólidos tipo gusano vertical. 1. Cuerpo del fermentador. 2. Sistema de transmisión de movimiento. 3. Mezclador tipo gusano o tornillo sin fin. 4. Sistema para toma de muestra. 5. Entrada de fluidos a la chaqueta. 6. Salida de fluidos de la chaqueta. 7. Corte transversal de la chaqueta. 8. Mirilla. 9. Entrada para carga del material. --- 10. Entrada de aire. 11. Salida de gases. 12. Descarga de material.

Revisión bibliográfica.

Autor	Fecha	Título del artículo	Publicación	Tipo de Reactor	Microorganismo	Sustrato	Producto	Observaciones
Durand A., Chereau D.	1988	A New Pilot Reactor for Solid-State Fermentation: Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp.	Biotechnol. Bioeng. Vol. 31, pp. 476-486	Dinámico. Caja rectangular con agitadores verticales desplazables (3).	Trichoderma viride T.S.	Remolacha de caña.	Proteína micelar	Agitadores: tornillos sinfin, 22 rpm y 6.5 cm/min. Caja 2 x 0.8 x 2.3 (m).
Sato K., Miyazaki S., Matsumoto M., Yoshizawa K. & Nakamura K.	1988	Pilot-Scale Solid-State Ethanol Fermentation by Inert Gas Circulation Using Moderately Thermophilic Yeast.	J. Ferment. Technol. Vol 66 No.2 pp. 173-180	Dinámico. Recipiente cilindrico agitado por aspas.	Saccharomyces cerevisiae K-701. Deficiente-resp ir.	Maiz	Ethanol	Vertical. 40 cm dia. 50 lbs. 1-2 rpm. 2 aspas horizontales.
Xu W.Q., Hang Y.D.	1988	Roller Culture Technique for Citric Acid Production by <i>A. niger</i> .	Process. Biochem. Agosto, pp. 117-118.	Dinámico. Tambor Rotatorio (Botellas).	Aspergillus niger	Pulpa de Manzana	Acido citrico	Botellas de vidrio: 110 x 285 mm. 190 g (65M)/2 Botellas medio c/3% v/v de Met-GH (p/evitar espor.) 3 dias 0.3 rpm.
Kargi F. & Cunne J.A.	1985	Solid-State Fermentation of Sweet Sorghum to Ethanol in a Rotary Drum Fermentor.	Biotechnol. Bioeng. Vol. XXVII, pp. 1122-1125.	Dinámico. Tambor rotatorio con deflectores inclinados.	Saccharomyces cerevisiae	Sorgo	Ethanol	Proceso anaerobico 35 C 1,5,10 y 40 rpm 22 cm diametro X 15 cm de altura.
Nishio K., Tai K. & Nagai S.	1979	Hydrolase Production by <i>Aspergillus niger</i> in Solid-State Cultivation.	European J. Appl. Microbiol. Bio technol. 8 pp 263-270	Dinámico. Tambor rotatorio de vidrio.	Aspergillus niger	Trigo (fibra)	Hidrolasas	Reactor inclinado sumergido parcialmente en un baño controlado (tipo evaporador al vacio)
Mukhopadhyay S.N.	1981	Increased Production of Cellulase of <i>trichoderma reesei</i> in STF and HRF by pH Cycling and Temperature Profiling.	Advances in Biotechnol. Vol II, pp 277-280	Dinámico. Tambor rotatorio no definido vs. tanque agitado (liquido)	Trichoderma reesei	Celulosa	Celulasas	No define el reactor para FSS. Conclusion: ambos sistemas tienen similares rendimientos de celulasas.
Giovannozzi-Ser manni & Huet M.C.	1987	Solid-State Fermentation of the Straw in a Pilot Rotatory Bioreactor.	CHIM. OGGI. No. 3 pp. 55-57.	Dinámico. Tambor rotatorio.	Pleurotus sp	Faja de trigo	Biomasa (micelio)	Tambor rotatorio aislado, 50 cm dia y 200 cm long., sist. de calefacción externo, 1 ciclo/12hrs.
Hrubant G.R., Rhodes R.A. & Orton M.L.	1989	Continuous Solid-Substrate Fermentation of Feedlot Waste with Grain.	Biological Wastes Vol 28, pp. 277-291	Dinámico. Tambor rotatorio. Modular (3).	Lactobacilos, 1 svaduras, colif ornes. (Lodo, es tiencol)	Maiz.	Ensilado: Ac. lactico y Ac. acetico.	Reactor con baffles mezcladores. 0.5 rpm. Equipado con tomadores de muestras.
Lindenfelser L.A. & Ciegler A.	1975	Solid-Substrate Fermentor for Ochratoxin A Production.	Appl. Microbiol. Mar., pp. 323-327	Dinámico. Tambor rotatorio. Seccionado (4)	Aspergillus ochraceus NRRL 3174	Trigo	Ochratoxin A	Con baffles. 33 cm dia. y 7.6 lar. Con tomadores de muestra.

Revisión bibliográfica.

Autor	Fecha	Título del artículo	Publicación	Tipo de Reactor	Microorganismo	Sustrato	Producto	Observaciones
Larroche C. & Bros J-B.	1986	Spore production of <i>Penicillium roqueforti</i> in Fermentors filled with Buckwheat seeds: Batch and Semi-Continuous Cultivation.	Appl.Microbiol.Biot ecnol.	Dinámico. Tambor rotatorio. Terminación conica.	<i>Penicillium roqueforti</i>	Trigo.	Esporas de Cuerpo: ss. y plexiglass. Vol. 30 l. <i>Penicillium roqueforti</i>	
Grant G.A. Har Y.W. & Anderson A.W.	1978	Pilot-Scale Semisolid Fermentation of Straw.	Appl.Environm.Microb 101. March. pp. 549-553.	Dinámico. Tanque con paletas agitadoras internas.	<i>Candida utilis</i> NRRL Y-1084	Faja (pastura). Perennial ryegrass (<i>Lolium perenne</i> Lambert)	Biomasa	La agitación se utiliza unicamente para la preparación del medio e inoculación. FSS estática.
Baldensperger J., Leimer J., Hannibal L. & Quinto P.J.	1985	Solid State Fermentation of Banana Wastes.	Biotechnology Letters vol. 7 No. 10 pp. 743-748	Dinámico. Tanque conico agitado (Petrin)	<i>Aspergillus</i> No. 2	Platano (Desperdicios)	Biomasa	Equipo controlador completo. Equipo para acondicionamiento de aire.
Deschaeps F. & Huet M.C.	1984	Beta-Glucosidase Production in Agitated Solid Fermentation, Study of its Properties.	Biotechnol. Letters Vol 6 No. 7 pp. 451-456	Dinámico. Tanque conico agitado (Petrin)	<i>Aspergillus phoenicis</i>	Café (Pulpa)	Beta glucosidas	Equipo completo de control automatico (T, Aereacion, pH y humedad)
Huerta S., Gutierrez M., Lopez R., Masucco A.E. & Viniegra G.	1986	Caracterización Técnica de un Fermentador Dinámico para Sustratos Solidos en Planta Piloto	Acad.Nac.Ingenieria, Mex. Vol 5 pp. 46-53	Dinámico. Tanque conico agitado (Sergito).	<i>Aspergillus niger</i> ceca 10	Yuca	Biomasa	Agitación 1 rpm X 5 min. Agitador estatico -> movimiento del recipiente.
Gibbons W.R. & Westby C.A.	1988	Technology and Economics of Ethanol Production from Fodder Beets Via Solid-Phase Fermentation.	Biotechnol.Letters Vol. 10 No. 9 pp 665-670	Dinámico. Tubular horizontal con tornillo interno sin fin p/cover sust	Levadura.	Pulpa de remolacha.	Etanol	Sist. semicontinuo. Tubo: 15.24 d. x 470 l (ca) chaqueta 30 C FSS: 72 hr.
Gibbons W.R., Westby C. A., Dobos T.	1986	Intermediate-Scale, Semicontinuous Solid-Phase Fermentation Process for Production of Ethanol from Sweet Sorghum.	Appl.Environmental Microbiol. Jan. pp. 115-122	Dinámico. Tubular horizontal con tornillo interno sin fin p/cover sustra	Levadura	Sorgo	Etanol	Sist. semicontinuo Tubo: 15.24 d. x 470 l. (ca) Chaqueta 30 C FSS: 72 hr.
Nagaune T., Nishimura, M. & Kobayashi .	1987	Cell Culture Method. (Patente).	European Patent Application.No.02446 73.Date:080587	Dinámico. Tubular horizontal y tubular vertical c/tornillo sin fin.	Varios. Reportado: A. oryzae (JCM2239).	Varios. Sinttico.	Varios. Reportador: a-amilasa.	Sustratos absorbidos en poliuretano de baja densidad. Liq. en exceso. Separación por prensado en sist. cónico final.
Deschaeps F., Giuliano C., Aster M.C. & Roussos S.	1985	Cellulase Production by <i>Trichoderma reesei</i> in Static and Mixed Solid-State Fermentation Reactors Under Nonaseptic Conditions.	Biotechnol.Bioeng. Vol. XXVII pp.1385-1388.	Estatico (Zymotis) y Dinamico (Petrin).	<i>Trichoderma reesei</i> F-470.	Cascara de trigo (80%) y trigo integral (20%)	Celulasas	Petrin con 65 lt. de vol. y Zymotis normal.

Revisión bibliográfica.

Autor	Fecha	Título del artículo	Publicación	Tipo de Reactor	Microorganismo	Sustrato	Producto	Observaciones
Ziffer J.	1988	Wheat Bran Culture Process for Fungal Amylase and Penicillin Production.	SSF in Bioconversions of Agr. Ind. Raw Mat. pp. 121-8	Estático. Botellas verticales con tubos p/ E/S de aire y termostato.	Aspergillus oryzae.	Salvado de trigo.	Amylasas	Botellas: 1 gal. Baño de temp. controlada Control de temperatura con aire y baño. Tambores rotatorios industriales.
Abdullah A.L., Tengender R.P. & Murphy V.G.	1985	Optimization of Solid Substrate Fermentation of Wheat Straw	Biotech. Bioeng. Vol. XXVII, pp. 20-27.	Estático. Charola horizontal dentro de un recipiente cónico.	Chaetomium cellulolyticum & Trichoderma reesei	Cáscara de trigo.	Proteína micelial	Vol. del recipiente: 6 lt Charola de 16 cm diámetro con malla No. 40 25 g. de Sustrato, por lotes y lotes alimentados.
Smith R.E., Osotnslp Ch., Bicho P. & Gregory K.F.	1986	Improvement in the Protein Content of Cassava by sporotrichum pulverulentum in Solid State Culture.	Biotechnol. Lett. Vol. 8 No. 1 pp. 31-36	Estático. Charolas dentro de un cilindro, con aireación independiente.	Sporotrichum pulverulentum.	Cassava roots.	Biomasa (micelio).	Columna con charolas internas, con base en el sistema de Rambault. 5 charolas, calentador/humidif. de aire, baño de agua
Redikulev J.V., Litvinenko L.A.	1984	Apparatus for Bioconversion of Vegetal Raw Material	Patente USA No. 4,686,189	Estático. Cilindro vertical con canastilla interna perforada.	Varios	Varios	Varios	Esterilizable: propagador de inóculo integrado equipo neumático y generador de vapor.
Yang S.S.	1988	Protein Enrichment of Sweet Potato Residue with Amylolytic Yeast by Solid-State Fermentation.	Biotechnol. Bioeng. Vol. 32, pp. 886-890.	Estático. Columna de vidrio hechiza, 6.3 d.int., 6.6 d.e., 70 long (cm)	Varios amilolíticos (hongos y levaduras).	Residuos de papa.	Biomasa	Mezclado del medio c/24 hr. FBS: 72 hr. Conclusion: Saccharomyces mejor que Niger.
Hang Y.D.	1988	Microbial Production of Citric Acid in Fixed-Bed Column Bioreactor.	Biotechnol. Letters Vol. 10 No. 6 pp. 421-426	Estático. Lecho empacado (Columnas)	Aspergillus niger	Pulpa de manzana.	Acido citrico	Columna: 39 x 3 cm. 50 g (50% H) Aire: 30 l/h.
Jetelaki-Horvat K. K.	1984	Cellulase Production of Phanerochete chrysosporium on a Solid Substrate Column.	Process Biochem. April pp. 65-66	Estático. Lecho empacado (columna)	Phanerochete chrysosporium ATCC32629	Desechos lignocelulosicos (harina de soya, licor de maiz, etc)	Celulasas	Columna empacada con proceso continuo de producción de celulasas.
Rodriguez J.A., Rechststedt W., Echevarria J., Sierra N., Delgado G., Daniel A. & Martinez O.	1986	Optimization of Solid-State Fermentation of Citrus Dried Peel by aspergillus niger in a Packed Bed Column.	Acta. Biotechnol. Vol. 6 No. 3 pp 253-258	Estático. Lecho empacado (columna).	Aspergillus niger Q4-2	Cáscara de cítricos seca (naranja)	Biomasa (micelio)	Columna 9 cm diam. 40 cm. largo, 1.2 kg materia H., con chaqueta. Aereación: 3 l. aire/kg sust. húm. mín. 60 hrs. proc.

Revisión bibliográfica.

Autor	Fecha	Título del artículo	Publicación	Tipo de Reactor	Microorganismo	Sustrato	Producto	Observaciones
Durand A., de la Broise D. & Blach re H.	1988	Laboratory Scale Bioreactor for Solid State Processes.	J.Biotechnol. No. 8 pp 59-66	Estático. Lecho empacado.	Trichoderma viride T.S.	Pulpa de caña de azúcar asentada.	Biomasa (micelio)	Dos cilindros con canasta removible con fondo perforado. Sist. control T y H rel.
Durand A., Pichon P. & Desgranges C.	1988	Approaches to K _{La} Measurements in Solid State Fermentation.	Biotechnol. Techiques Vol 2 No. 1 pp. 11-16	Estático. Lecho empacado.	No reportado.	Pulpa de caña asentada.	No reportado.	Técnica para medición del K _{La} . Efecto de diferentes variables sobre el K _{La} se reportan.
Cochet N., Nonus J.M. & Lebeault	1988	Solid-State Fermentation of Sugar-Beet	Biotechnol. Lett. Vol.10 No.7 pp. 491-496.	Estático. Lecho empacado. (reactor tubular).	Saccharomyces cerevisiae 59	Azúcar de Remolacha.	Etanol	Solo 1 exp. en el reactor tubular. La mayoría en frascos.
Czajkowska B. & Ilnicka-Olejniczak D.	1989	Biosynthesis of Protein by Microscopic Fungi in Solid State Fermentation. III The Effect of Different Cultivations Methods and Various Media	Acta Biotechnol. Vol. 9, No. 4, pp. 317-324.	Estático. Tubos (12 cm alt), Charolas, tubo vertical y pila rectangular	Aspergillus oryzae A. u 11. (Preselecciona do).	Papa (pedazos y cosida), remolacha, etc.+ extrac.de cereales	Proteína micelial	4 Estudios: tubos, charolas perforadas, columna y pileta estatica.
Hecht V., Rosen W. & Schuegerl K.	1985	Conversion of Cellulose into Fungal Cell Mass in Solid State Culture.	Appl.Microbiol.Biotechnol. Vol. 21, pp 189-191	Estático. Tubular con charolas internas perforadas.	Chaetomium cellulolyticum ATCC 32319	Celulosa microcristalizada, salvado de trigo lo.vapor Co.NHC	Proteína micelial	Tubo: 70 x 60 cm, aislado, Temp.= 37 C Sistema sencillo de humidificación de aire.
Grajel W.	1988	Production of Protein by Thermophilic Fungi from Sugar-Beet Pulp in Solid-State Fermentation	Biotech.Bioeng. Vol. 32, pp. 255-260	Estático.Tubo vertical con depositos removibles con fondo perforado.	Termofilicos(T. aurantiacus, Mucor pusillus.)	Remolacha.	Proteína micelial	Sistema de acondicionamiento de aire charola estacionaria de hasta 40 cm. de altura.
Mitchel D.A., Greenfield P.F. & Doelle H.W.	1988	Development of a Model Solid-State Fermentation System	Biotechnol.Techniques Vol 2 No. 1 pp. 1-6	Frascos conicos, charolas. Botellas de vidrio y lecho empacado.	Rhizopus oligosporus	Yuca (harina), soportada en alginato y kappa-carragenan.	Biomasa	Evaluacion de 4 sistemas con el sustrato descrito. Resultados: 1.Lecho emp., 2.Frascos conicos, 3.Charolas, 4.Botellas.
Bauer W.	1985	Solid-State Fermentation in Fluid-Bed Reactor Raises Amino Acid Yields (Conference abstract)	Bioprocessing.Technol. Nov. pp. 2-3	Lecho Fluidizado	Levaduras	Medio liquido sintético.	Amino acidos	Equipo Lab: .15 a Dias. Planta piloto: 1.0 a dias. Alta producción de amino ácidos.

Revisión bibliográfica.

Autor	Fecha	Título del artículo	Publicación	Tipo de Reactor	Microorganismo	Sustrato	Producto	Observaciones
Rittenbacher L., Schöler M. & Bauer M.	1987	Modelling a Solid-State Fluidized Bed Fermenter for Ethanol Production with <i>S. cerevisiae</i> .	Bioprocess Engineering No.2 pp.25-31	Lecho Fluidizado (por aire).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Glucosa, sulfato de amonio, extrac. levadura y fosf. potasio	Etolol.	Bioreactor de lecho gasfluidizado instrumentado totalmente adición continua de sustrato medición de CO ₂ , ETOH y celdas
Hong K., Tanner D., Malaney G.M. & Danzo B.J.	1989	Protein Entrainment During Baker's Yeast Fermentation on a Semi-Solid Substrate in an Air-fluidized Bed Fermentor.	Bioprocess Engineering No. 4 pp. 209-215	Lecho Fluidizado. (Con aire)	Levadura de panadería (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>)	Almidón de papa hidrolizado enzimáticamente.	Proteína extracelul ar.	Sist. de acond. de aire (T y H) con vapor directo y una columna de hum. y otra de elimin. de exceso de agua.
Hong K., Tanner R.D., Crooke P.S. Malaney G.M.	1988	Semisolid State Fermentation of Baker's Yeast in an Air-Fluidized Bed Fermentor.	Appl. Biochem. Biotech nol. Vol.18 pp. 3-17	Lecho fluidizado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Papa pre-digerida con alfa-amilasa s de <i>A. Dryzae</i> .	Biomasa	Sistema de acondicionamiento de aire (filtrado) p/ humidificar y controlar la temperatura.
Hong K., Park D.H., Tanner R.D., Reed M.M. & Malaney G.M.	1987	Optically Monitoring Baker's Yeast (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>) Growing in an Air-fluidized/expanded Potato Starch Matrix.	J. Ind. Microbiol. No. 2 pp. 187-193.	Lecho fluidizado (con aire).	Levadura de panadería (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>)	Almidón de papa hidrolizado enzimáticamente.	Biomasa (Levaduras)	Sist. de acondic. de aire (T y H) con vapor directo y una columna de humid. y otra de eliminación exceso de agua.
Adisasaito S, Mihaltz P., Karis M.N. & Tengerdy R.P.	1987	Preparation of Fungal Starter Culture in Liquid Fluidized bed Reactor	Biotechnol. Techniques Vol. 1 No.3 pp 175-180	Lecho fluidizado (liquidofluidizado)	<i>Trichoderma reesei</i> (Rut C-30)	Mazorca de maíz.	Biomasa (micelio)	Columna de vidrio enchaquetada: 3.5 cm d.i. X 100 cm alt., canicas como soporte, bomba perist. recircular medio.
Adisasaito S. & Karis M.N.	1987	Fluidized Bed Solid Substrate Fermentation <i>trichoderma reesei</i> Fermentation.	Ann. Biochem. Eng. Symp. pp. 47-57	Lecho fluidizado.	<i>Trichoderma reesei</i> (Rut C-30)	Mazorca de maíz.	Biomasa (micelio).	Comparación entre lecho gasfluidizado y liquidofluidizado, ambos buenos rendimientos.
Shana G.	1988	Developments in Bioreactors for Fuel Ethanol Production.	Process Biochem. Oct pp 138-145.	Varios	Varios	Varios	Etolol	Revisión a nivel amonio de diferentes reactores (liquidos y solidos).