B448c

INSTITUTO TECNÓLOGICO DE CELAYA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

" ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DEL LACTOSUERO CON CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS "

P O R

JOSÉ ENRIQUE BOTELLO ALVAREZ

TESIS PRESENTADA AL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

CELAYA, GTO. JUNIO 1999

sep INSTITUTO TECNOLOGICO de celaya

I.Q./008/99

Asunto: Aprobación de Impresión
de Tesis de Doctorado.

6 de Mayo de 1999.

M.C. J. Guadalupe Michel Nava
Jefe del Depto. de Ingeniería Química.
P r e s e n t e

De acuerdo con la convocatoria hecha por esa Jefatura a su digno cargo, con el fin de determinar la aprobación de impresión del Proyecto de Tesis de Doctorado, titulado: ***"ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DEL LACTOSUERO CON CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS"*** presentado por él(la) **M.C. JOSÉ ENRIQUE BOTELLO ALVAREZ,** comunico a usted que esta Comisión Revisora de tesis ha tenido a bien aprobar la impresión de este trabajo.

Lo anterior, para los efectos consiguientes.

Atentamente,

Dra. Cristina Coronado Velasco
Presidente

Dr. Pedro A. Quintana Hernández
Secretario

Dr. Fernando Tiscareño Lechuga
Vocal

Dr. Alejandro Gómez Muñóz
Suplente

ssh*

Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N
A.P. 57, C.P. 38010, Celaya, Gto.,
Correo Electrónico: lince@itc.mx
Http://www.itc.mx
Conmutador 01 461 1 7575
Fax 01 461 1 7979

PREMIO GUANAJUATO A LA CALIDAD 1997

A Dios por darnos el premio de esperarte.

Tere y Quique

Camine por tus praderas, gritándote
nunca te mostraste con tan solo abrir los ojos,
supe de ti a través de las noches grises
cuando tu reías borracha por tu grandeza
y en mi delirio por atraparte
sólo me quedaba con migajas de tu estela.

Tu me atacaste como los dioses a Odiseo
me hiciste caer en la turbulencia de la duda
y comiste de mis horas de búsqueda
flaqueaste mi alma con la desesperación que muerde.

Otros han allanado tus peñascos
dejando pistas difíciles de seguir,
los tienes en el recuerdo del tiempo
y los muestras como madre orgullosa,
dime pues su secreto.

Recostada en sus mantos
miro al pequeño hombre y abrió sus labios:
tu solo camina sin volver la mirada atrás eres
joven e impaciente.

Rique.

A mi abuelito Chema

A mi abuelita Zena

A mi Matella

Espero que estén en un jardín de rosas,
platicando a la sombra
del mango en la huerta de abajo.

AGRADECIMIENTOS.

A mi esposa por llenar mi vida de amor y de todas esas cosas que me hacen feliz. Quiero que sepas que eres lo que más quiero y que gracias a tu apoyo y esfuerzo he podido terminar este trabajo.

Más que en relevo de las cosas idas
En la expectativa de los logros nuevos
Te sigo queriendo.

Alberto Cortez.

A la Doctora Cristina, por haberme dado libertad e independencia en mi proyecto de Tesis y sobre todo por sus consejos y por siempre ofrecer un dialogo positivo.

Reading maketh a full man;
Conference a ready man;
And writing an exact man.

Francis Bacon

A mi grupo de trabajo. Creo que sin ustedes este proyecto no hubiera sido tan enriquecedor para mi. Cesar (Pachuca boy), Fabiola y su Bebe, Fer, Luzma, Tere, Chela, Raúl, Martha, Lupita y Luisa. Especialmente a mis fieles amigos: Martha, Hector y Moy por toda su dedicación, responsabilidad y todas esas noche sin dormir (Siempre encontramos una solución).

¡Adelante, paso de vencedores!

José María Cordoba

A mis sinodales : Dr. Alejandro Gómez, Dr. Pedro Quintana, Dr. Fernando Tiscareño y la Dra. Mayra De La Torre, por todos sus consejos y amabilidades y su amistad.

Ave Cesar, morituri te salutant

Suetonio

A mi Amá y mi Pá por dedicarme su vida y lo mejor de ellos.

A mis Hermanas: Zena, Soco, Chata y la pequeña Jimena y Tere por ser siempre su hermano consentido y por todo ese cariño y amor que siempre me han dado. También a Raúl, Bar, Pao y Cati por su cariño.

A mi Pá Toño, mis Tios, mis Tias y sobre todo a mis Primos por todos esos momentos que hemos pasado juntos.

A la familia De Santiago Rincón, por su cariño y apoyo.

Uno para todos y todos para uno

Dumas

A mis amigos: Chucho, Tolin, Leonar, Turru, Gasparito, Escamilla, York , Ruiz, Esparza, Chespi, Patiño, Mosquito, Zurdo, Julio, Tarzan, Padilla, Gigo, Silva y Quiquito. A pesar de las pocas ocasiones en que nos hemos visto, siempre he encontrado en ustedes una amistad fresca y me han dado alientos para seguir adelante, siempre los tengo presentes en mi corazón.

A mis amigos de la cueva: El Mr., Arturo Barragan, Hugo, Javier Valencia, Daniel, Hector, Beto, Bath, Armandillo, Venegas, Chava y Vicente y especialmente a Omar Guerrero, Myke Pantoja y Ponchito, por compartir todas esas platicas, cenas, borracheras y parrandas, pero sobre todo por que logramos casi ser como hermanos.

A mis amigos: Eusebio, Alejandro y Juanito Barajas, por apoyarnos mutuamente en nuestros estudios y por que algún día todos esos sueños lleguen a ser realidad.

De tres maneras se entiende la amistad:
Honesta, deleitable y provechosa.

Lope de Vega

Al personal del Departamento de Ingeniería Química: Gloría, July, Julio Rocha, Don Juve, Chavita, Lupe, Don Tito, Lolis y todos los demás Maestros y Profesores.

Al Instituto Tecnológico de Celaya, por ser mi segunda casa y encontrar en él tanto apoyo y las mejores amistades que he tenido. Por siempre LINCE.

Home, sweet home

Payne

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico durante mis estudios.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato por su oportuno apoyo económico para terminar mis estudios de Doctorado.

Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV Unidad Zacatenco en México, D.F., especialmente a la Dra. Mayra De La Torre por su apoyo a mi proyecto de Tesis.

A la empresa TEKCHEM de Salamanca, Gto. por su apoyo económico durante mis estudios.

A la empresa EQUINOX de Celaya, Gto. por su apoyo en la realización de mi trabajo experimental.

En general quiero dar un agradecimiento a todas las personas que de algún modo colaboraron en la realización de este trabajo.

GRACIAS MEXICO

Hallaré un camino o me lo abriré

Anibal

LISTA DE FIGURAS

3.1	Reactor tipo tanque agitado.	30
3.2	Efecto de la temperatura, el pH y el extracto de levadura sobre la concentración de ácido propiónico alcanzada en la fermentación propiónica del lactosuero.	33
3.3	Velocidades de reacción experimentales para la biomasa, la lactosa, el ácido propiónico y el ácido acético	35
3.4	Algoritmo del programa CL3765.FOR para la optimización de los parámetros del modelo de la cinética de la fermentación con células libres descrito por las ecuaciones 3-3 a 3-6.	38
3.5	Cinética de la fermentación propiónica con células libres a temperatura de 37°C, pH de 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas.	39
3.6	Residuales de los datos experimentales respecto a las predicciones del modelo.	40
3.7	Cinética de la fermentación propiónica con células libres a temperatura de 37°C, pH de 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas del modelo con términos de retraso.	43
3.8	Residuales de los datos experimentales respecto a las predicciones del modelo con términos de retraso.	44
3.9	Cinética de la fermentación propiónica con células libres a temperatura de 35°, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas.	48
3.10	Residuales de los datos experimentales respecto a las predicciones del modelo con términos de retraso.	49
3.11	Cinética de la difusión de la lactosa y los ácidos propiónico y acético hacia las esferas de soporte. Temperatura de 35°C y pH de 5.5. Datos experimentales y curvas calculadas.	54
3.12	Algoritmo del programa CLCI3555.FOR para la solución del modelo de difusión y reacción descrito por las ecuaciones 3-22 a 3-47.	60

3.13 Cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizadas a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas. 61

3.14 Crecimiento celular dentro de las esferas como unidades formadoras de colonias por mililitro de soporte (UFC). 62

3.15 Cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizadas a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas de acuerdo a los parámetros de la Tabla 3.11 (Modelo con crecimiento). 64

3.16 Cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizadas a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas utilizando el modelo sin crecimiento. 67

3.17 Gráficas de residuales en las predicciones para la lactosa de los modelos con y sin crecimiento respecto a los datos experimentales reportados por Herrera (1997). 68

3.18 Gráficas de residuales en las predicciones para el ácido propiónico de los modelos con y sin crecimiento respecto a los datos experimentales reportados por Herrera (1997). 69

3.19 Reactor con lecho fluidizado. 72

3.20 Datos experimentales y curvas calculadas de la fermentación propiónica con células inmovilizadas en un lecho fluidizado, a temperatura de 37°C y pH de5.5. 76

3.21 Gráfica de residuales para la lactosa y el ácido propiónico. 77

LISTA DE TABLAS

1.1	Fermentaciones Propiónicas	9
3.1	Diseños experimentales	32
3.2	Parámetros estimados del modelo sin términos de retraso.	37
3.3	Parámetros estimados del modelo con retraso.	42
3.4	Análisis de varianza.	45
3.5	Análisis de varianza para los modelos con células libres.	46
3.6	Contribuciones a la suma de cuadrados.	46
3.7	Parámetros estimados del modelo a 35°C, 5.5 de pH y 2.5 g/l de extracto de levadura.	47
3.8	Análisis de varianza para el modelo a 35°C, 5.5 de pH y 2.5 g/l de extracto de levadura..	50
3.9	Contribuciones a la suma de cuadrados.	51
3.10	Condiciones de operación.	59
3.11	Parámetros estimados del modelo con crecimiento.	63
3.12	Parámetros estimados del modelo sin crecimiento.	66
3.13	Análisis de varianza para los modelos con y sin crecimiento.	66
3.14	Parámetros cinéticos del modelo sin crecimiento para la fermentación en el lecho fluidizado.	75
3.15	Análisis de varianza para en modelo sin crecimiento en el lecho fluidizado.	78
3.16	Comparación de parámetros cinéticos a temperaturas de 35 y 37°C	78

NOMENCLATURA

A	Concentración de ácido acético	(g/l)
C	Concentración de una especie	(g/l)
$\overline{C}al_i$	Dato calculado	(g/l)
d_p	Diámetro de la partícula	(m)
D_{EC}	Difusividad efectiva de C	(m^2/h)
D_i	Difusividad molecular	(m^2/h)
EL	Extracto de levadura	(g/l)
$Ex\overline{p}_i$	Dato experimental	(g/l)
F_0	Flujo de alimentación	(m^3/h)
G	Velocidad de masa superficial	(kg/hm^2)
k	Número de parámetros	(adim.)
K	Constante de velocidad de reacción	(1/h)
K_d	Constante de mortandad	(1/h)
K_i	Parámetro de ajuste	(g/l)
K_m	Coeficiente global de transferencia de masa	(m/h)
K_m	Constante de Michaelis Menten	(g/l)
K_P	Constante de inhibición por producto	(g/l)
K_S	Constante de saturación	(g/l)
K_{S0}	Parámetro de ajuste	(adim.)
m	Constante de mantenimiento	(1/h)
N	Velocidad de transferencia de masa	(Kg/hm^2)
n	Número de repeticiones	(adim.)

p	Número de puntos experimentales	(adim.)
P	Concentración de producto (ácido propiónico)	(g/l)
Par	Vector de parámetros	(adim.)
r	Coordenada radial	(m)
R	Coordenada radial adimensional	(adim)
r_i	Velocidad de reacción	(g/lh)
R_D	Relación de difusividades	(adim.)
R_0	Radio de la esfera	(m)
S	Concentración de sustrato (lactosa)	(g/l)
S_0	Concentración inicial de lactosa	(g/l)
S_1^2	Variancia por falta de ajuste	(g^2/l^2)
S_2^2	Variancia experimental	(g^2/l^2)
t	Tiempo	(h)
T	Temperatura	(^0C)
TR	Término asociado al retraso	(adim.)
u	velocidad	(m/h)
V_I	Volumen de Soporte	(m^3)
V_L	Volumen de Líquido	(m^3)
V_T	Volumen total	(m^3)
Y	Coeficiente metabólico de conversión	(adim.)
$\bar{Y}_i$	Dato promedio	(g/l)
Y_i	Dato calculado	(g/l)
Y_{ij}^*	Dato experimental	(g/l)

$\bar{Y}_{sup}$	Efecto en el nivel superior	(g/l)
$\bar{Y}_{inf}$	Efecto en el nivel inferior	(g/l)
X_B	Concentración de biomasa	(g/l)

LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro de ajuste	(adim.)
β	Parámetro de ajuste	(adim)
ε	Fracción de huecos en el reactor	(adim.)
λ	Exponente cinético	(adim.)
μ	Viscosidad	(kgm/h)
μ_{MAX}	Tasa específica de crecimiento máxima	(1/h)
η	Factor de efectividad	(adim.)
ϕ	Módulo de Thiele	(adim.)
ρ	Densidad	(kg/m^3)
τ	Tiempo adimensional	(adim.)
υ	Grados de libertad	(adim.)

SUBINDICES

A	Referente al ácido acético	(adim.)
a	Variable adimensional	(adim.)

b	Referente al medio o caldo de fermentación	(adim.)
I	Variable en el soporte	(adim.)
L	Variable en el medio líquido o caldo de fermentación	(adim.)
n	Exponente cinético	(adim.)
o	Referente al inicio	(adim.)
P	Referente al producto o al ácido propiónico	(adim.)
S	Referente a la superficie o a la lactosa	(adim.)
X	Referente a la biomasa	(adim.)

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA i
AGRADECIMIENTOS iv
LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE TABLAS ix
NOMENCLATURA x
ÍNDICE xiv
RESUMEN xvii

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.

1.1 OBJETIVO. 2

1.2 LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS. 2

1.3 LA FERMENTACIÓN PROPIÓNICA. 3

1.4 EL MEDIO DE CULTIVO. 4

1.5 EL MICROORGANISMO. 5

1.6 EL PRODUCTO. 6

1.7 ANTECEDENTES. 6

CAPÍTULO 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y FUNDAMENTOS.

2.1 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS LIBRES. 13
2.1.1 CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN CON CÉLULAS LIBRES. 14
2.1.2 MODELOS CINÉTICOS. 16

2.2 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS INMOVILIZADAS. 18
2.2.1 MODELO DEL SISTEMA INMOVILIZADO. 19
2.2.2 TRANSPORTE EXTERNO DE MASA. 20
2.2.3 TRANSPORTE INTERNO DE MASA Y ETAPA REACTIVA (MODELO). 22

2.3 CONSIDERACIONES EN LA ESTIMACIÓN DE LA CINÉTICA INTRÍNSECA PARA SISTEMAS CON CÉLULAS INMOVILIZADAS. 24

2.4 ESTIMACIÓN DE LAS DIFUSIVIDADES EFECTIVAS. 25

2.5 FACTOR DE EFECTIVIDAD. 26

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

3.1 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS LIBRES. 29
3.1.1 CONDICIONES DE OPERACIÓN DE MÁXIMA PRODUCCIÓN. 29
3.1.2 MODELO CINÉTICO. 35
3.1.2.1 PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE. 44

3.2 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS INMOVILIZADAS. 46
3.2.1 CINÉTICA INTRÍNSECA. 46
3.2.2 ESTIMACIÓN DE LAS DIFUSIVIDADES EFECTIVAS. 49
3.2.3 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN CON CÉLULAS INMOVILIZADAS. 53
3.2.3.1 MODELO CON CRECIMIENTO CELULAR EN EL SOPORTE 53
3.2.3.2 MODELO SIN CRECIMIENTO CELULAR EN EL SOPORTE. 61
3.2.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS MODELOS. 64
3.2.3.4 FACTOR DE EFECTIVIDAD. 64

3.3 LECHO FLUIDIZADO Y OPERACIÓN EN CONTINUO. 67
3.3.1 DESCRIPCIÓN DEL REACTOR. 68
3.3.2 OPERACIÓN DEL REACTOR. 68
3.3.3 FERMENTACIÓN EN EL LECHO FLUIDIZADO. 71

CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1 CONCLUSIONES. 75
4.2 RECOMENDACIONES. 76

BIBLIOGRAFÍA. 85

APÉNDICE A TAREAS PREVIAS A LA FERMENTACIÓN. 89

APÉNDICE B TAREAS DURANTE LA FERMENTACIÓN. 97

APÉNCICE C TÉCNICAS DE ANÁLISIS. 100

APÉNDICE D PROGRAMAS DE CÓMPUTO. 110

APÉNDICE E DATOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS. 132

RESUMEN

ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DEL LACTOSUERO CON CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS.

PRESENTADO POR:

JOSÉ ENRIQUE BOTELLO ALVAREZ.

En este trabajo se describen y fundamentan los desarrollos experimentales y teóricos utilizados para la estructuración y validación de los modelos matemáticos obtenidos para la representación cinética de la fermentación del lactosuero con células libres e inmovilizadas para la obtención del ácido propiónico. Con este trabajo se contribuye a la búsqueda de alternativas para el aprovechamiento del lactosuero, materia prima abundante en nuestra región, que lejos de ser explotado eficientemente se está convirtiendo en una fuente importante de contaminación.

El estudio de la fermentación con células libres de *Propionibacterium acidipropionici* CDBB 1040 se llevo a cabo en un fermentador tipo tanque agitado. Se realizaron tres diseños experimentales secuenciales y un análisis de superficie de respuesta para determinar la temperatura, el pH y la cantidad de extracto de levadura en el medio de cultivo que maximizan la concentración de ácido propiónico. Además se construyó un modelo matemático para representar la cinética de la fermentación bajo estas condiciones él cual reproduce los datos experimentales con una varianza por falta de ajuste menor o igual a la varianza experimental calculada.

El estudio de la fermentación con células de *Propionibacterium acidipropionici* inmovilizadas en esferas de poligalacturonato de calcio se llevo a cabo en un reactor tipo tanque agitado, bajo las condiciones de operación recomendadas por Herrera (1997). Se estudiaron dos modelos para representar la cinética de esta fermentación. En el primer modelo se supone que existe crecimiento de biomasa en el interior de las esferas (modelo con crecimiento) mientras en el segundo se supone que existe un equilibrio entre las velocidades de crecimiento y mortandad de la biomasa de manera que la cantidad de ésta permanece constante (modelo sin crecimiento). En los dos modelos se consideran los procesos de reacción y difusión. Las difusividades efectivas de la lactosa y los ácidos propiónico y acético se determinaron por ajuste de la solución de un modelo Las difusividades efectivas de la lactosa y los ácidos propiónico y acético se determinaron por ajuste de la solución de un modelo de difusión a los datos experimentales de las velocidades con las que se difunden éstas especies en esferas de poligalacturonato de calcio.

En el modelo con crecimiento la cinética intrínseca es obtenida a partir de datos de la fermentación con células libres. La información obtenida y las difusividades efectivas se integraron en el modelo de difusión y reacción para representar la cinética de la fermentación con células inmovilizadas. Sin embargo, fue necesario modificar el modelo y optimizar sus parámetros característicos a fin de obtener un buen ajuste con los datos experimentales.

En el modelo sin crecimiento se utilizó como cinética intrínseca la ecuación de Michaelis Menten para representar la velocidad de consumo de lactosa; mientras la velocidad de producción de ácido propiónico se consideró directamente asociado a dicha velocidad de consumo por un coeficiente metabólico de conversión .

Ambos modelos son estadísticamente adecuados para representar los datos experimentales sin embargo, el modelo sin crecimiento presenta la ventaja de solo tener tres parámetros de ajuste. Se encontró que el factor de efectividad del soporte era muy cercano a la unidad, lo que indica que la etapa de reacción es la controlante de las velocidades observadas de consumo de lactosa y de producción de ácidos.

Se estudió la fermentación con células inmovilizadas en un lecho fluidizado, encontrándose que el modelo obtenido para la representación de los datos en un fermentador tipo tanque es capaz de reproducir los datos experimentales tanto en operación por lote como continua.

DIRIGIDA POR:

DRA. CRISTINA CORONADO VELASCO.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN.

El ácido propiónico es un químico importante en el área de los conservadores de alimentos que se produce principalmente por procesos petroquímicos a escala industrial. A pesar de que desde principios de este siglo se han hecho propuestas para sintetizarlo microbiológicamente en grandes cantidades, esto no ha sido posible hasta la fecha por no ser un proceso competitivo económicamente. La producción por vía microbiológica apunta a satisfacer la creciente demanda del mercado hacia la "onda verde" como contrapartida a las síntesis petroquímicas tradicionales. Esto es específicamente importante en este caso, ya que cerca del 60% de la producción global de ácido propiónico se destinan a la elaboración de conservadores de alimentos y granos de cereales.

Este trabajo se generó como parte de un programa en donde intervinieron países iberoamericanos como Argentina, Chile, República Dominicana, México y Uruguay. Este programa pretende desarrollar la tecnología para aprovechar diferentes subproductos agroindustriales abundantes en estos países para la producción en gran escala del ácido propiónico, con el doble propósito de disminuir los problemas de contaminación ambiental e incrementar el valor agregado de estos subproductos.

El Tecnológico de Celaya fue una de las instituciones que representaron a México en este programa asignándosele el estudio del aprovechamiento de la lactosa del suero vacuno como fuente de carbono en la fermentación propiónica. En este trabajo se presentan estudios de cinética y efectos de las condiciones de operación en la fermentación tanto en sistemas con células libres como con células inmovilizadas en esferas de soporte, así como los diferentes modelos matemáticos que representan los procesos estudiados. También se estudiaron algunas configuraciones de bioreactores para maximizar las productividades.

El suero lácteo se produce como un subproducto de la industria lechera, está compuesto básicamente por una solución acuosa de lactosa, proteínas y sales minerales y representa casi el noventa por ciento de la leche entera (Alais, 1994). En los países desarrollados se utiliza para obtener ácido láctico, lactosa cristalizada, alcohol, concentrados proteícos y otros productos alimenticios (Amiot, 1991). Para el aprovechamiento del suero es necesario la implementación de procesos especializados que demandan una inversión de capital considerable, sin tener un atractivo económico alto. Por esta razón en países subdesarrollados como México, el lactosuero es poco aprovechado, utilizándose en pequeñas cantidades como alimento para ganado, preparación de algunas bebidas refrescantes y otros alimentos, mientras grandes cantidades de suero son tiradas con las aguas de lavado creando de esta manera un foco de contaminación considerable.

En los últimos años las legislaciones sanitarias en todo el mundo se han vuelto más estrictas y han obligado a las empresas a instalar plantas de tratamiento de aguas residuales. En la actualidad existe también la tendencia en muchas industrias en la reutilización de sus residuos para obtener productos que les represente una recuperación económica. En este sentido, es posible aprovechar el lactosuero para obtener diferentes productos de interés comercial a través de la fermentación de la lactosa. Además, se debe aprovechar que en los últimos años los productos naturales han cobrado un mayor interés por el publico consumidor que los productos sintéticos.

En este trabajo se presentan modelos matemáticos y recomendaciones que pueden convertirse en herramientas útiles para el desarrollo de la fermentación propiónica como un proceso alternativo para la mejor explotación del lactosuero recurso abundante en nuestra región. También se contribuye en el marco teórico de los procesos biotecnológicos incorporando conceptos y aplicaciones de ingeniería de reactores químicos que sirvan de base para el avance tecnológico necesario para llevar muchos de estos procesos que se encuentran a un nivel de laboratorio hacia la explotación comercial.

1.1 OBJETIVO.

El objetivo principal de este trabajo fue la construcción de modelos matemáticos representativos de la cinética de la fermentación propiónica del lactosuero vacuno con células libres e inmovilizadas en esferas de poligalacturonato de calcio.

Los objetivos secundarios fueron estudiar los efectos de las condiciones de operación, específicamente; el pH, la temperatura, la composición del caldo de cultivo en la producción de ácido propiónico tanto en el sistema con células libres como con células inmovilizadas. También se estudió la fermentación en un reactor tubular de lecho fluidizado, así como se probó la estabilidad en operación del soporte utilizado.

1.2 LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS.

En la actualidad existe una demanda de nuevas fuentes de alimentos para una población creciente y de formas de producción que sean compatibles con la conservación de los ecosistemas. La biotecnología parece ser la respuesta, ya que han surgido un sin fin de procesos biológicos económicamente viables que están incursionando de manera importante en ramos tradicionalmente químicos. La biotecnología nace a partir del desarrollo de la microbiología en el siglo XIX marcado por el descubrimiento del papel de los microorganismos en la transformación de la materia orgánica y puede ser definida como la aplicación controlada de agentes biológicos vivos, muertos o componentes de ellos en

operaciones técnicamente útiles para la manufactura de productos u operaciones de servicios (Scriban, 1985).

Los procesos biotecnológicos se han clasificado como procesos de primera, segunda y de tercera generación (Quintero, 1981). Los procesos de la primera generación se desarrollaron principalmente hacia 1975 en donde se utilizan células no recombinantes cuyos productos pueden ser intracelulares o extracelulares con una alta pureza y un valor comercial moderado, son procesos típicos de esta generación la obtención del etanol, el ácido cítrico, el ácido láctico, los antibióticos, entre otros. Los procesos de la segunda generación fueron desarrollados en la década de 1975 a 1985. El tipo de microorganismos utilizados son recombinantes y los productos obtenidos son macromoléculas intracelulares de pureza muy alta. Productos típicos de esta generación son la insulina humana, la cefalosporina y otros, todos ellos con un alto valor comercial. En la tercera generación, desarrollada a partir de 1985, los microorganismos utilizados son recombinantes, también aparecen los productos obtenidos por cultivo de tejido vegetal y animal. Sus productos son extracelulares, de alto peso molecular y estructura compleja que por la vía química resultarían en una gran cantidad de pasos de síntesis, son producidos con una altísima pureza por procesos extremadamente caros siendo su producción mundial limitada y su precio muy alto en el mercado. Productos típicos de esta generación son el Factor VIII, uroquinasas, enzimas terapéuticas, etc.

Quintero (1981) clasificó las etapas involucradas en todo proceso biotecnológico como: etapas previas, etapa de fermentación y etapas posteriores. En las etapas previas se puede hablar de actividades como el diseño del medio de cultivo, las manipulaciones genéticas de los microorganismos para lograr la inducción de características deseadas, tareas de esterilización entre otras. En la etapa de fermentación se busca optimizar las condiciones de operación, la elección del fermentador más adecuado, la implementación de sistemas con inmovilización o recirculación de células y otras mejoras, mientras en las etapas posteriores se realizan operaciones de separación y purificación de los productos finales.

1.3 LA FERMENTACIÓN PROPIÓNICA.

Las fermentaciones son procesos mediante los cuales los microorganismos obtienen energía por reoordenamiento de compuestos orgánicos sin consumo de oxigeno gaseoso, a través de una serie de reacciones bioquímicas complejas que reciben el nombre de rutas metabólicas (Mc Gilvery, 1977). En la práctica una fermentación involucra un agregado de microorganismos como agentes activos en los procesos de transformación, un medio de cultivo que contenga los nutrientes esenciales para el desarrollo de los microorganismos y un compuesto orgánico (sustrato) que será degradado y transformado en el producto o los productos de interés, así como el equipo físico para proveer las condiciones ambientales adecuadas para realización del proceso.

El ácido propiónico derivado de una fermentación fue obtenido por Strecker en 1854 y por Pasteur y Fitz en 1879 (Playne, 1985). La fermentación propiónica puede ser realizada por una gran variedad de bacterias siendo las del género *Propionibacterium* las más importantes. La síntesis microbiana se realiza a través de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido dicarboxílico que es la más común y la ruta del ácido acrílico que solo es usada por algunas bacterias como la *Megasphaera elsdenii* y la *Clostridium propionicum*.

En las fermentaciones propiónicas se han empleado como sustratos la glucosa, la maltosa, la lactosa, el lactato de sodio, la sacarosa y la xilosa entre otros (Boyaval y Corre, 1987). El ácido propiónico raramente es formado como producto único, generalmente es producido con el ácido acético, dióxido de carbono, vapor de agua y energía como se puede observar en las siguientes ecuaciones generalizadas:

$$3\,A\,Lactico \Rightarrow 2\,A.\mathrm{Pr}opiónico + A.Acético + CO_2 + H_2O \qquad 1\text{-}1$$

$$3\,Glucosa \Rightarrow 4A.\mathrm{Pr}opiónico + 2\,A.Acético + 2CO_2 + 2H_2O + 12ATP \qquad 1\text{-}2$$

La fermentación propiónica tradicional con células libres en fermentadores de tanque agitado se caracteriza por ser un proceso con una baja productividad, causada por un efecto inhibitorio del propio ácido propiónico sobre el crecimiento de los microorganismos, que impide alcanzar concentraciones altas de éstos en el caldo de cultivo y que por consecuencia se tienen bajas velocidades de transformación. Por esta razón se han implementado sistemas con recirculación e inmovilización de células en los cuales es posible tener altas concentraciones de biomasa e incrementar de manera significativa la productividad. En la sección 1.7 se revisán estos sistemas con mayor profundidad.

1.4 EL MEDIO DE CULTIVO.

Un medio de cultivo se puede definir como una mezcla compleja de substancias capaces de satisfacer las exigencias nutricionales particulares de microorganismos específicos (Scriban, 1985). En la formulación de un medio de cultivo se incluyen diversas sales minerales, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas hormonas y factores de crecimiento (Butler y Dawson, 1992).

El hidrato de carbono, comúnmente llamado sustrato, en algunos casos es degradado completamente hasta dióxido de carbono para constituir la fuente de energía que asegura el crecimiento de los microorganismos. En otros casos la degradación sólo es parcial y el hidrato de carbono además de proveer energía se transforma en otro producto que puede ser útil para el hombre y que se denomina metabolito. Las vitaminas, los aminoácidos, las proteínas y otras substancias actúan como cofactores metabólicos y son necesarios para la síntesis de

constituyentes celulares. Los factores de crecimiento son nutrientes específicos que los microorganismos no pueden sintetizar y que son indispensables para su crecimiento. Por último, las sales minerales juegan un papel importante en la activación de las reacciones enzimáticas.

El medio de cultivo que se utilizó en este trabajo fue preparado a partir de lactosuero vacuno enriquecido con diversas sales minerales y extracto de levadura, que es una fuente de vitaminas B y otros compuestos orgánicos de nitrógeno y carbono que actúan como promotores del crecimiento (Ver Apéndice A-2). El lactosuero, como ya se había mencionado, es una solución acuosa de lactosa, proteínas solubles y sales minerales de color amarillento que se separa de la cuajada durante la fabricación de queso y que representa aproximadamente el 90% de la leche entera. La lactosa del lactosuero es el hidrato de carbono que es utilizado para la síntesis del ácido propiónico a través de su fermentación.

La lactosa es un glúcido reductor que pertenece al grupo de los diholósidos formada por una molécula de α ó β-glucosa y otra de β-galactosa. Su fórmula estructural presenta dos isómeros la α y β-lactosa. La solubilidad de la lactosa es relativamente baja en comparación con la de otros azucares y es función de la temperatura que rige el equilibrio entre la α-lactosa más soluble y la β-lactosa. La lactosa es sensible al calor, entre 110° C y 130° C la forma hidratada pierde su agua de cristalización, a los 150° C se torna amarilla y a temperaturas más elevadas tiene lugar un oscurecimiento debido a su caramelización (Veisseyre, 1988).

1.5 EL MICROORGANISMO.

El microorganismo utilizado para este proyecto es el *Propionibacterium acidipropionici CDBB 1048.* Esta bacteria fue donada por el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV Unidad Zacatenco en México D.F. Su habitat natural es el intestino de los vacunos. Es un bacilo corto y curvo, Gram positivo y anaerobio facultativo. Fermenta diferentes substratos como lactosa, lactatos, glucosa, xilosa y sacarosa para producir ácido propiónico. Esta bacteria es mesófila por lo que se desarrollan bien entre 30 y 37°C y en medios casi neutros (pH entre 6.5-7.5), frenando su desarrollo en un pH de 5.5. Los cuidados y las técnicas de conservación de esta bacteria se pueden ver en los Apéndices A-1 y A-2.

Otras bacterias capaces de sintetizar el ácido propiónico son listadas a continuación (Playne, 1985):

Propionibacterium (9 especies)
Veillonella parvula
Veillonela alcalescens
Selenomonas ruminantion
Selenomas sputigena
Clostridium propionicum

Clostridium novyi
Megasphaera elsdenii
Bacteriodes fragilis
Bacteriodes ruminicola
Fusobacterium necrophorum
Arachnia propionica
Anaerovidrio lipolytica

1.6 EL PRODUCTO.

El ácido propiónico es un líquido cristalino volátil de consistencia oleosa y olor penetrante, su peso molecular es 74.08 g/mol y su fórmula química es $CH_3 - CH_2 - COOH$, su punto de congelación y ebullición son de –22.4 y 141.1°C respectivamente, es ligeramente menos denso que el agua y soluble en ésta.

Este ácido carboxílico es manufacturado en la industria química por el proceso OXO por la Corporación Unión Carbide en los Estados Unidos con una producción anual 67000 toneladas. En este proceso una olefina reacciona con monóxido de carbono e hidrógeno en presencia de un catalizador de cobalto. La reacción se lleva a cabo a una presión de 20-30 MPa y una temperatura de 30 a 40°C. Otro proceso alterno fue desarrollado por la compañía Celanese en los Estados Unidos. Este proceso consiste en la oxidación con aire del propano en fase líquida.

En 1982, el consumo total en los Estados Unidos fue de 107000 toneladas de las cuales un 28% se destinó a la producción de propionatos de sodio y calcio utilizados como conservadores de alimentos, un 27% para la fabricación de conservadores de granos, un 20% para la fabricación de plásticos, un 20% en la preparación de herbicidas y el restante 5% en la preparación de drogas antiartríticas, fijadores de perfumes y sabores, etc.

1.7 ANTECEDENTES.

Playne (1985) revisó los distintos procesos que se han implementado para producir el ácido propiónico por fermentación. En los años veintes y treintas de este siglo aparecen los primeros intentos por producir el ácido propiónico a nivel industrial mediante procesos de fermentación. Se estudiaron diferentes sustratos: glucosa, fructosa, residuos de la fermentación de acetona y butanol, jugo de maíz y extractos de papas. Las bacterias más estudiadas fueron las del género *Propionibacterium*. Se estudiaron también inóculos mixtos de *Propionibacterium* y *Lactobacillus casei* logrando un significativo aumento en la velocidad de fermentación y conversiones más altas de la fuente de carbono.

La mayoría de los procesos fueron llevados a cabo por lote con células libres. Las fermentaciones tenían una duración hasta de 10 días alcanzándose concentraciones hasta de 30 g/l de ácido propiónico. Los primeros intentos por tener procesos continuos fueron a finales de los años treintas introduciéndose sistemas de retención de células en materiales porosos o sistemas de recirculación de células. Después de la segunda guerra mundial la investigación de la fermentación propiónica se volcó hacia la utilización de los efluentes lignocelulósicos de los procesos de la pulpa de madera. Se desarrollaron diversas investigaciones probándose la inmovilización celular, la recirculación de células, cultivos mixtos y otras mejoras a la etapa de fermentación. También se probaron procesos de separación y concentración como la destilación, la destilación con acarreadores y la extracción con solventes.

Hacia 1990 se renovó el interés por producir el ácido propiónico por vía fermentativa en busca de satisfacer la demanda de un público consumidor que prefiere cada vez más los productos de origen natural sobre los sintéticos. También se trata de aprovechar subproductos o desechos de las agroindustrias para obtener un producto que represente alguna utilidad económica y evitar que estos se conviertan en fuentes de contaminación. Las investigaciones que se han realizado en esta década tienden a incrementar la productividad buscando mejores medios de cultivos (Quesada-Chanto y Col., 1994), desarrollando microorganismos más resistentes a la inhibición por ácido propiónico (Woskow y Glatz, 1991), encontrando condiciones de operación más adecuadas (Pérez, 1997) y creando nuevos bioreactores más eficientes con sistemas de recirculación e inmovilización de células (Boyaval y Corre, 1987; Vivian y Shang, 1992b). A continuación se hace una revisión de algunas de estas investigaciones.

Quesada-Chanto y Col. (1994) estudiaron la fermentación propiónica de la sacarosa para producir ácido propiónico y vitamina B_{12} en un reactor tanque de 3 litros con una velocidad de dilución de $0.05h^{-1}$. Optimizaron la composición del caldo de cultivo (extracto de levadura 12.0 g/l, fosfato diácido de potasio 2.0 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado 0.20 g/l, sulfato ferroso heptahidratado 2.5 g/l, 5,6 dimetil bencimidazol 2.0g/l). Encontraron que la adición de cloruro de cobalto hexahidratado (20 g/l) maximiza la producción de vitamina B_{12} como producto intracelular sin tener un efecto significativo sobre la producción de ácido propiónico. La concentración de sacarosa la estudiaron en un rango de 30 a 170 g/l, sin que se encontrara inhibición por efecto del sustrato en el crecimiento de biomasa ni en la producción de ácidos. Los autores encontraron también que el pH tiene un efecto muy marcado, pues una diferencia en una unidad de pH puede representar una duplicación en la producción de ácidos. El pH óptimo se encuentra entre 6.5 y 6.8. También estudiaron el efecto de la temperatura, para la producción del ácido propiónico, en el intervalo de 26 hasta 40°C encontrándose que 37°C era la temperatura óptima. De 30 a 35°C encontraron que esta variable no era significativa.

Vivian y Shang (1992a) realizaron un estudio comparativo de lactosa, lactato de sodio y glucosa como fuentes de carbono en la fermentación propiónica. Sus experimentos los realizaron en un fermentador de 2.2 litros con 50 ml. de inóculo con un crecimiento de 24

horas. La operación fue realizada por lote, a una temperatura de 30°C y un pH de 6.6. Estos autores encontraron que la mejor fuente de carbono es el lactato pues con éste se alcanza la conversión a propiónico más alta ($Y_{P/S}$ = 0.518) comparada con la obtenida con la glucosa o con la lactosa. Otras ventajas con este sustrato fueron: la poca producción de biomasa, siendo ésta más productiva, y la tenue caída de pH. Esta última es de relevante importancia en la operación de un reactor tubular pues, por las características propias de este sistema, se dificulta el control de pH. También encontraron que el crecimiento celular cesa a un pH de 4.5 cuando se utiliza lactosa y glucosa, y a un pH de 5.0 cuando se utiliza lactato.

Vivian y Shang (1992b) implementaron un sistema en continuo con inmovilización de células utilizando un reactor tubular de flujo ascendente con un diámetro interno de 5 cm y una altura de lecho de 15 cm. El lecho estaba formado con un rollo de tela de algodón que proporcionó una fracción de huecos del 90%. Este reactor fue inoculado con 20 ml y se dejó crecer la biomasa a reflujo durante 3 días. El reactor fue alimentado con lactato de sodio (45 g/l) y operado en un intervalo de velocidades de dilución de 1 d^{-1} a 5 d^{-1} en donde se implementó una corriente de recirculación para mejorar la turbulencia en el reactor (velocidad de reflujo 1000 veces superior a la de alimentación). En este trabajo se estudió el efecto de los nutrientes en el crecimiento, (extracto de levadura y tripticasa) así como el efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad del reactor a dos diferentes valores de pH en la alimentación (7.0 y 6.0). El extracto de levadura fue estudiado en intervalo de 1 a 10 g/l y la tripticasa siempre se suministró en una relación 1:2 con el extracto. Se encontró que las concentraciones óptimas de estos nutrientes en la alimentación variaban de acuerdo al pH utilizado lo que sugiere una interacción importante entre el pH y la cantidad de nutrientes. Encontraron también que la velocidad de dilución tiene un efecto inversamente proporcional sobre la concentración de ácidos alcanzada en la corriente de salida. La concentración promedio de biomasa en el reactor fue de 37.0 g/l y se alcanzó una productividad máxima de 1.28 g/l·h.

Boyaval y Corre (1987) utilizaron un reactor de 3 litros tipo tanque con reciclo de células por ultrafiltración alcanzando una productividad volumétrica de 14.3 g/ l·h (28 g/l de ácido propiónico) que es la más alta alcanzada si se revisa la Tabla 1.1 donde ellos mismos resumen los resultados obtenidos por otros autores. La concentración de biomasa alcanzada fue de 100g/l. Los experimentos fueron llevados a 30° C y un pH de 7.0. Se probaron como sustratos el permeado de lactosuero (12 g/l de biomasa) y el lactato de sodio (1.8 g/l de biomasa) en fermentaciones batch de 75 horas con células libres encontrado que sus productividades eran de 0.4 y 0.072 g/l·h, respectivamente, lo cual es contradictorio con los resultados de Vivian y Shang (1992a) resumidos anteriormente en los cuales se mencionaban las ventajas de utilizar lactato.

En la operación en continuo las velocidades de dilución estudiadas son de 0.14, 0.32, 0.58 y 0.95 h^{-1} observándose que al ir incrementándose se presentan problemas de taponamiento en la membrana de ultrafiltración y un decaimiento en la conversión de lactosa a ácidos. También se encontró que la tasa específica de producción de ácido propiónico respecto

a la biomasa decrece al incrementarse ésta (0.44g/g·h a 10g/l de biomasa y 0.17g/g·h a 80 g/l de biomasa). Estos autores deducen que este decremento se debe a perturbaciones fisiológicas en el interior de las células. Proponiendo como solución la remoción de células para provocar nuevamente el crecimiento de células nuevas más activas. Estos inconvenientes hacen que la estabilidad en la operación de este sistema sea difícil de obtener.

Tabla 1.1 Fermentaciones propiónicas.

Organismo	Sistema	Sustrato	C. Celular (g/l)	Propiónico (g/l)	Productividad (g/lh)	Ref.
P.acidipropionici	Lote	Lactosa Glucosa	-	2.3	0.033	Sermar y Shaw (1923)
P.acidipropionici	CSTR	Glucosa Xilosa	-	3.74	0.19	Clausen y Gaddye (1984)
P.Acidipropionici	RFT	Glucosa Xilosa	-	-	0.49	Clausen y Gaddye (1984)
P. Sp	Inmovilizado	Lactacto	-	5.0	2.0	Calvin y Col.(1985)
P. acidipropionici	CSRT-UF	Xilosa	95	18	2.2	Carrondo y Col. (1987)

Blanc y Goma (1987a) implementaron un sistema con recirculación de células y de la corriente de productos. Trabajaron isotérmicamente a 35°C y a un pH constante de 6.6 con la adición de hidróxido de amonio concentrado. El caldo de cultivo contenía 64 g/l de suero en polvo y 4 g/l de extracto de levadura. En operación por lote se obtuvieron concentraciones finales de 12.0 g/l de biomasa, 16.6 g/l de ácido propiónico y 6.9 g/l de ácido acético, la tasa específica de crecimiento máxima fue 0.1 h^{-1} con una productividad de 0.35g/l·h. En la operación en continuo la mayor productividad alcanzada fue de 2.14 g/l h para una velocidad de dilución de 0.25 h^{-1}. En estas condiciones la concentración de biomasa era de 98.0 g/l, la concentración de ácido propiónico fue de 18.0 g/l y su coeficiente de producción respecto al sustrato $Y_{P/S}$=0.423. Sin embargo, mencionan que estas condiciones no se pueden mantener por demasiado tiempo pues la concentración de ácidos empieza a disminuir, concluyendo que esto se debe a que gran parte de la biomasa son células muertas o atrofiadas que son poco activas. Por lo que hicieron una remoción de biomasa observando que nuevamente empieza a haber crecimiento en el reactor y a la vez la producción de ácidos comienza a recuperarse. Recuérdese que esta misma situación fue encontrada por Boyaval y Corre (1987).

Blanc y Goma (1987b) realizaron un estudio de cinética de producción para observar los efectos de inhibición en el crecimiento de biomasa por ácido propiónico y por biomasa. En

las fermentaciones por lote con reposición parcial de medio fresco la velocidad específica de crecimiento empieza a decrecer sin anularse a una concentración crítica de ácido propiónico (12 g/l) finalmente se anula a 15 g/l, a ésta concentración la velocidad de producción de ácido propiónico alcanza un valor constante hasta detenerse a una concentración de 35g/l. Esta característica remarca que el ácido propiónico sea considerado como un metabolito mixto pues se sigue produciendo aun cuando la biomasa se encuentra en su fase estacionaria. En las fermentaciones continuas con recirculación de biomasa también se observa una inhibición en su crecimiento por biomasa a una concentración crítica de 98 g/l. Los autores correlacionan tanto la velocidad específica de crecimiento (μ) y de producción (ν) a la concentración de ácido propiónico y de biomasa utilizando la expresión lineal de Luedeking y Piret (Scriban, 1985). Este modelo muestra dos secciones rectas, en la primera existe una caída constante de las velocidades específicas respecto a la concentración de ácido propiónico y de biomasa hasta unirse con la segunda que muestra una velocidad constante con pendiente casi nula hasta llegar a un punto crítico donde se cancela. En este trabajo se identifican claramente los puntos de inhibición de crecimiento de biomasa tanto por ácido propiónico como por biomasa.

Obaya y Col. (1992) estudiaron la fermentación propiónica por lotes de la sacarosa de las mieles de caña. Realizaron sus estudios en un fermentador tipo tanque a una temperatura de 30°C y un pH de 7.0 unidades. Encontraron que existía una inhibición en el crecimiento de la biomasa cuando se alcanzaba una concentración de 18.5 g/l de ácido propiónico y que no había inhibición por sustrato en un intervalo de concentración de 50 a 84 g/l. Sus resultados fueron 12.5 g/l de biomasa, 22.5 g/l de ácido propiónico, un coeficiente de producción respecto al sustrato $Y_{P/S}$= 0.38 y una productividad de 0.35g/ l·h.

Magaña (1995) implementó la técnica de inmovilización de *Propionibacterium acidipropionici* en poligalacturonato de calcio. La selección de este soporte fue hecha considerando que este material no tiene efectos tóxicos sobre el microorganismo, ni en el uso final del producto como conservador de alimentos. También encontró que las esférulas de soporte tienen buena resistencia mecánica y que la actividad del biocatalizador se puede mantener en periodos largos de tiempo (4 meses de prueba).

Pérez (1997) estudió el efecto de la temperatura, el pH, la cantidad de extracto de levadura y el por ciento de inoculación en la fermentación con células libres. Este investigador encontró que la temperatura en un intervalo de 25 a 35°C no tiene un efecto significativo; mientras el pH en un valor entre 6.0 y 6.5, bajas cantidades de extracto de levadura (5 g/l) y altos porcentajes de inóculos (10 %) favorecen la producción de ácido propiónico.

Herrera (1997) estudió la fermentación propiónica con células inmovilizadas en poligalacturonato de calcio determinando la carga óptima de células en el soporte (7 g/l). Además, estudió el efecto de la temperatura y del pH, encontrando que la productividad del sistema tiende a incrementarse a temperaturas superiores a 35°C mientras el pH no tiene un efecto significativo.

En el estudio de fermentación propiónica al igual que otras investigaciones en esta área, son pocos los modelos matemáticos desarrollados, que son herramientas indispensables en el progreso tecnológico de estos procesos. En la literatura se han encontrado algunos modelos de la fermentación alcohólica con células inmovilizadas y de sistemas con enzimas inmovilizadas que por las analogías encontradas sirvieron de base para la elaboración del modelo para la fermentación propiónica con células inmovilizadas. A continuación se presentan los puntos más importantes de algunas citas bibliográficas.

Melick y Col. (1987) mencionaron que en un modelo representativo de una fermentación con células inmovilizadas se deben considerar: el régimen de flujo en el bioreactor, los coeficientes externos para la transferencia de masa del fluido a la superficie y viceversa, las difusividades efectivas de sustratos y productos en el interior del soporte y la cinética intrínseca de las velocidades de consumo, producción y crecimiento de sustratos, productos y biomasa respectivamente.

Hossain y Do (1989) presentaron un modelo generalizado con diferentes expresiones de cinéticas intrínsecas para reacciones enzimáticas en sistemas inmovilizados, En este modelo aparecen dos grupos adimencionales importantes: el número de Biot y el módulo de Thiele. El Biot es un grupo que relaciona el transporte externo caracterizado por un coeficiente global y la difusividad efectiva que representa el transporte interno. El modulo de Thiele relaciona la velocidad de reacción intrínseca con la velocidad de transferencia de masa interna. Estos parámetros son importantes en la caracterización de una reacción heterogénea, como un proceso controlado por la etapa de reacción o por la velocidad de transferencia de masa interna o externa, sin embargo existen pocas correlaciones para evaluar sus diferentes términos y algunos autores recurren a expresiones desarrolladas para sistemas químicos donde generalmente la fase continua es un gas (Godia y Col., 1987).

Uno de los factores más relevantes en la construcción de un modelo matemático en estos sistemas es como evaluar el crecimiento de la biomasa en el interior de las esferas de soporte. Algunos autores (Luong, 1985; Godia y Col., 1987; Melick y Col., 1987) consideran que la concentración inicial de biomasa permanece constante a través del tiempo y que está uniformemente distribuida en las esferas. Godia y Col. (1987) encontraron experimentalmente que la cantidad de biomasa inmovilizada en un fermentador tubular variaba a lo largo del reactor y asumieron que la concentración de biomasa inicial decaía en forma lineal con la coordenada axial del reactor pero permanecía constante en el tiempo.

Ollis y Sayles (1992) realizaron un estudio teórico en el cual incorporan una ecuación que rige el crecimiento de la biomasa en el interior de las esferas de soporte a un modelo de difusión y reacción, encontrando que la concentración de biomasa podía variar radialmente dependiendo de los valores de los parámetros cinéticos y de transporte de masa considerados

en el módulo de Thiele. Las distribuciones variaban desde perfiles de concentración de biomasa casi uniforme hasta aquellos en los que la biomasa se concentraba en una película cercana a la superficie. Karel y Robertson (1989) en un sistema aerobio de *Pseudomona putida* inmovilizada en fibras porosas de polietileno determinaron por técnicas de autoradiografía que la biomasa sólo crecía en una película de 25μm en la superficie del soporte.

Otra consideración importante es la suposición de la nula liberación de células al medio. Gencer y Mutharasan (1983), en la fermentación alcohólica con levadura inmovilizada por atrapamiento en gel en un reactor tubular en operación continua, encontraron que aproximadamente el 5 por ciento de la biomasa se encontraba libre en el medio por lo que su efecto no fue considerado en su modelo. Vivian y Shang (1992b) en la fermentación propiónica con células inmovilizadas en fibra de algodón encontraron que la concentración global de biomasa en el reactor era de 37g/l mientras en el medio líquido oscilaba entre 1 y 3 g/l.

Nakasaki y Col. (1989) presentaron también un modelo para la fermentación alcohólica con levadura inmovilizada, en su modelo también incorporan la ecuación que rige el crecimiento de la biomasa. Estos autores presentan simulaciones de casos reales encontrando que existe un buen ajuste de sus predicciones con los datos experimentales. También estudiaron los perfiles radiales de las concentraciones de sustratos, productos y biomasa que permite entender más la fenomenología de estos sistemas.

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y FUNDAMENTOS.

La fermentación con células inmovilizadas en un soporte se debe entender como un sistema reactivo heterogéneo, en el cual se involucran procesos de reacción y de transferencia de masa tanto a nivel extrapartícula como intrapartícula. En este trabajo se decidió estudiar cada una de las etapas por separado y posteriormente conjuntarlas para tratar de explicar el comportamiento global del sistema mediante un modelo bajo condiciones de operación adecuadas para la producción de ácido propiónico.

En la etapa reactiva es importante conocer cuales son las relaciones entre los sustratos, los productos y los microorganismos involucrados y los efectos que tienen las condiciones de operación sobre la orientación del sistema hacia incrementar la producción de ácido propiónico. Considerando estos aspectos, se estudió la fermentación con células libres fijándose las metas de buscar las condiciones de máxima producción y desarrollar un modelo que represente el comportamiento cinético observado bajo estas condiciones.

En la parte de inmovilización se fijó como meta la construcción de un modelo que fuera capaz de reproducir los resultados experimentales reportados por Herrera (1997). Para lograr este fin se tuvieron que proponer diferentes modelos y realizar una serie de experimentos para poder evaluar tanto parámetros de transporte como parámetros propios de la cinética intrínseca.

2.1 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS LIBRES.

Pérez (1997) estudió los efectos de algunas variables, sobre la producción de ácido propiónico durante 60 horas de fermentación con células libres en un bioreactor tipo tanque agitado, en los siguientes intervalos: para la temperatura entre 25 y 35°C; para el pH entre 6.0 y 7.0 unidades; para la cantidad de extracto de levadura agregada al medio de 5 y 10 g/l, y para el por ciento de inóculo entre 5 y 10%. Del análisis de variancia de sus resultados se concluyó que la temperatura no tenía un efecto significativo sobre la producción de ácido propiónico, no así el pH y la cantidad de extracto de levadura que la favorecían hacia los valores menores, 6.0 unidades y 5 g/l, respectivamente; mientras que el por ciento de inóculo aumentaba la producción hacia el valor mayor, 10 %. También encontró que las interacciones entre los factores eran importantes; sin embargo, en el estudio de la superficie de respuesta para encontrar un punto de máxima producción, no se encontraron puntos de pendiente cero catalogándose ésta como una superficie de loma en ascenso.

Debido a que existe duda en el efecto de la temperatura sobre la producción de ácido propiónico y principalmente por la sospecha de que la superficie presentara un punto de ensilladura en la temperatura. En este trabajo se propuso un nuevo diseño de experimentos ampliando el intervalo del mismo sobre los factores relevantes y en las direcciones de ascenso en la producción obtenidas por Pérez (1997).

2.1.1 CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN CON CÉLULAS LIBRES.

En las reacciones microbiológicas siempre intervienen sustratos que serán sujetos a una degradación, una masa celular o enzimática responsable de la degradación, y los productos correspondientes. En estos sistemas reactivos intervienen una serie de mecanismos complejos difíciles de caracterizar. Desde el punto de vista ingenieril son de interés los efectos dinámicos globales manifestados por los cambios en las variables representativas definidas como: el consumo de los sustratos esenciales, el crecimiento de la biomasa y la formación de productos de interés.

Cualquier reacción microbiológica puede escribirse en forma simplificada de la siguiente manera:

$$S + X_B \longrightarrow X_B + P + CO_2 \qquad 2\text{-}1$$

donde S es la concentración del sustrato esencial (g/l); X_B es la concentración de biomasa (g/l) que actúa como reactante y producto a la vez; P es la concentración del producto principal (g/l) y CO_2 es el dióxido de carbono desprendido durante la fermentación. Las cantidades de biomasa y de productos formados a partir del sustrato esencial consumido están relacionadas con los coeficientes metabólicos de conversión ($Y_{S/X}$, $Y_{P/S}$) que se definen a continuación:

$$Y_{S/X} = \frac{S_0 - S_f}{X_{Bf} - X_{B0}} \qquad 2\text{-}2$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_0 - P_f}{S_0 - S_f} \qquad 2\text{-}3$$

En estas ecuaciones los subíndices 0 y f se refieren a las concentraciones al inicio y al final respectivamente de un periodo de tiempo dado.

Schugerl (1987) clasificó las reacciones microbiológicas como: Tipo I, Tipo II y Tipo III, según la forma como se relacionan los sustratos y los productos con el crecimiento del microorganismo.

Reacción Tipo I.

El producto principal aparece como resultado del metabolismo energético primario por la oxidación directa del sustrato. La formación de productos, el consumo de sustrato y el crecimiento de biomasa guardan una relación directa de proporcionalidad. Son ejemplo de éstas la producción de etanol, ácido glucónico y ácido láctico. Las curvas de velocidades de crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos contra tiempo son muy similares. Las curvas de tasas específicas de crecimiento, consumo y producción se caracterizan por presentar un máximo.

Reacción Tipo II.

La formación del producto principal es resultado indirecto del metabolismo energético primario. Las curvas de velocidad de reacción son complejas pudiendo presentar más de un máximo en el tiempo. El consumo del sustrato esencial inicialmente es proporcional al crecimiento de biomasa y en la etapa final a la formación de productos. Un ejemplo típico es la producción de ácido cítrico.

Reacción Tipo III.

Este grupo comprende todas las reacciones microbiológicas en las cuales las moléculas complejas (antibióticos, vitaminas) son sintetizadas de productos simples iniciales. En estas reacciones se distinguen dos fases. La fase de crecimiento en la cual existe una cerrada relación entre el crecimiento celular y el consumo de sustratos y solo pequeñas cantidades de producto son formadas y la fase de producción en la cual predomina la formación de productos, en ésta existe solo un ligero crecimiento de células y el consumo de sustrato parece ser nulo. Un ejemplo típico es la producción de penicilina.

2.1.2 MODELOS CINÉTICOS.

Los modelos que a continuación se presentan son genéricamente llamados no estructurados, en estos las propiedades de las células se consideran promediables y uniformes, de esta manera, el material celular únicamente es caracterizado por su peso, mientras su estructura biológica y su estado no son considerados.

Como se mencionó anteriormente existen varios tipos de reacciones microbiológicas clasificadas por las relaciones entre las velocidades de consumo, de producción y de crecimiento. En general el consumo de sustratos y la formación de productos se puede presentar como asociada al crecimiento de biomasa (consumo o producción asociada) ó asociadas a la cantidad de biomasa existente (consumo o producción no asociado) ó asociadas a ambos. Leudeking y Piret (Scriban, 1985) propusieron el siguiente modelo para la producción de ácido láctico:

$$r_P = Y_{P/X} r_{X_B} + mX_B \qquad 2\text{-}4$$

donde r_P es la velocidad de producción de ácido láctico (g/l·h); $Y_{P/X}$ el coeficiente metabólico de conversión de biomasa a producto (adimensional); r_{XB} es la velocidad de crecimiento de biomasa (g/l·h) y m es llamada constante de mantenimiento (1/h). El primer término de la derecha representa la producción asociada al crecimiento y el segundo término representa la producción no asociada. Los productos que son formados sólo como asociados se les llama metabolitos primarios (fase de crecimiento exponencial), los metabolitos que se forman como no asociados se les llama secundarios (fase estacionaria) y los que se producen en ambas formas se les denomina mixtos. La velocidad de crecimiento de biomasa es función de las concentraciones de sustratos, productos y de la biomasa misma. Una ecuación comúnmente utilizada para representarla fue propuesta por Monod en 1942 (Scriban, 1985):

$$\frac{dX_B}{dt} == \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \qquad 2\text{-}5$$

donde μ_{MAX} es la tasa especifica máxima de crecimiento de la biomasa (1/h); t es el tiempo (h) y K_S es un parámetro llamado constante de saturación (g/l) que representa la separación sobre el intervalo de concentraciones del sustrato, entre aquella donde el crecimiento es extremadamente dependiente del sustrato, y la otra donde el crecimiento es independiente del sustrato.

No siempre es posible describir el crecimiento microbiano con la ecuación de Monod, por lo que se han propuesto numerosas modificaciones a ésta para reducir las desviaciones observadas entre las mediciones experimentales y el modelo. Algunas de las causas de estas desviaciones son: la alta fuerza iónica presente cuando la concentración del sustrato es elevada y las altas concentraciones de biomasa que inducen restricciones de transporte de sustratos y productos que limitan el crecimiento. En estos casos se recomienda usar los siguientes modelos (Schugerl, 1987):

$$\frac{dX_B}{dt} = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_{S0}S^0 + S} \qquad 2\text{-}6$$

$$\frac{dX_B}{dt} = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + K_{S0}S^0 + S} \qquad 2\text{-}7$$

donde K_{S0} es un parámetro de ajuste (adimensional) y S° es la concentración inicial del sustrato (g/l). También la concentración de biomasa puede representar una inhibición gradual en el crecimiento durante las fermentaciones, en este caso se puede usar la ecuación de Contois.

$$r_X = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S X_B + S} \qquad 2\text{-}8$$

El crecimiento microbiano puede ser inhibido también por la presencia del algún inhibidor natural del medio o por los sustratos y los productos. El mecanismo de inhibición en estos casos es explicado como una secuencia de reacciones de equilibrio en la que se forman diversos complejos con la biomasa como son los complejos biomasa-inhibidor, biomasa-sustrato, biomasa-producto, biomasa-sustrato-sustrato y otros de los cuales sólo el complejo biomasa-sustrato se desdobla a nueva biomasa y producto. Para estos casos se han propuesto los siguientes modelos:

Inhibición por agente externo:

$$\frac{dX_B}{dt} = \frac{\mu_{MAX}}{\alpha} \frac{SX_B}{K_S + S} \qquad 2\text{-}9$$

$$r_X = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{\alpha K_S + S} \qquad 2\text{-}10$$

Inhibición por sustrato:

$$r_x = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \qquad 2\text{-}11$$

Inhibición por producto:

$$r_x = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \qquad 2\text{-}12$$

donde α (adimensional) es una constante de inhibición, K_I (g/l) es la constante de inhibición por sustrato y K_P es la constante de inhibición por producto (g/l). Cuando en el medio de cultivo la concentración de nutrientes es baja y muchos de los microorganismos concluyen su periodo de vida la tasa de mortandad supera a la de crecimiento y la cantidad de microorganismos vivos empieza a disminuir. Para representar este período la ecuación de Monod se modifica de la siguiente manera:

$$\frac{dX_B}{dt} == \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} - K_D X_B \qquad 2\text{-}13$$

donde K_D es la constante de mortandad (1/h)

2.2 FERMENTACION CON CÉLULAS INMOVILIZADAS.

La inmovilización de células es el proceso en el cual un paquete microbiano activo queda unido a un soporte sólido. Existen diferentes formas de inmovilización: Ataque a superficie, atrapamiento en una matriz porosa, retención en membrana y agregado celular. Brodelius y Vandame (1987) mencionan que el uso de sistemas inmovilizados hace posible reemplazar las fermentaciones tradicionales por lotes por procesos continuos, provocando un drástico decremento en el tamaño del equipo y de los costos; así como mejorando el control del proceso, reduciendo costos de operación, minimizando tiempos muertos y mejorando la uniformidad del producto. Adicionalmente el fermentador puede operar a altas velocidades de dilución sin el arrastre del paquete celular y removiendo en forma continua metabolitos tóxicos.

En este trabajo se estudió la fermentación propiónica con células inmovilizadas. El ácido poligalacturónico fue el soporte seleccionado y el atrapamiento *in situ* por dos fases fue la técnica implementada (Montes y Magaña, 1991). Este sistema ofrece las ventajas de no tener un efecto tóxico sobre las células, presenta un rápido proceso de polimerización a temperatura ambiente que permite conservar la viabilidad de las células, además las esferas de soporte formadas presentan tamaños y formas uniformes.

Herrera (1997) estudió los efectos de la edad del microorganismo al momento de inmovilizar, la concentración inicial de biomasa en el soporte, la cantidad de extracto de levadura en el medio de cultivo así como las condiciones de temperatura y de pH en el bioreactor. Sus experimentos fueron realizados en un reactor tanque agitado utilizando una relación de 1/6 entre el volumen de soporte y el volumen de medio. Herrera (1997) encontró que la biomasa debería ser inmovilizado cuando el inóculo de cultivo tuviera una edad de 60 horas a 33°C en medio MRS, la cantidad de biomasa a inmovilizar que recomienda es de 7 gramos por litro de soporte, preparado con una solución que contenga el 50 % en volumen de la suspensión de células y el 50 % de una solución acuosa de ácido poligaturonico al 8% en peso/volumen, mientras que recomienda 2.5 g/l de extracto de levadura en el caldo de cultivo y mantener un pH de 5.5 y una temperatura de 35°C en la fermentación.

2.2.1 MODELO DEL SISTEMA INMOVILIZADO.

Las fermentaciones con células inmovilizadas son sistemas reactivos heterogéneos, en el cual un paquete celular se encuentra retenido en un soporte sólido que está sumergido en el fluido de fermentación. La actividad metabólica con células inmovilizadas en varios casos difiere al observado en células libres siendo el carácter heterogéneo del sistema el responsable de esta variación.

El desarrollo de modelos matemáticos para sistemas inmovilizados ha sido lento; sin embargo, recientemente se han presentado modelos más completos pues su aplicación contribuye a crear estrategias de diseño de nuevos procesos, entendimiento de los fenómenos que ocurren dentro del reactor así como la identificación de las etapas limitantes al proceso reactivo (Melick y Col., 1987).

Considerando un sistema reactivo heterogéneo la conversión de reactantes a productos debe presentar la siguiente serie de etapas secuenciales (Smith, 1981):

1. Transporte de reactantes desde el seno del fluido hasta la interface fluido-sólido.
2. Transporte de reactivos dentro de la partícula catalítica.

3. Adsorción de reactivos en los sitios activos del catalizador.
4. Transformación a productos.
5. Desorción de productos.
6. Transporte interno de productos hasta la superficie del catalizador.
7. Transporte del producto de la interface sólido - fluido hasta el seno del líquido.

En general, las etapas se pueden agrupar como: procesos externos de transferencia de masa (etapas 1 y 7), procesos reactivos (etapas 3,4 y 5) y procesos de transporte interno de masa (etapas 2 y 6). En condiciones de estado estable las velocidades individuales de todas las etapas son las mismas. La velocidad global observada es entonces dependiente de la etapa controlante que se caracteriza por tener la velocidad individual más lenta. Es importante conocer el comportamiento de cada uno de estos procesos para la modelación adecuada de los mismos.

2.2.2 TRANSPORTE EXTERNO DE MASA.

El transporte externo de masa está íntimamente relacionado con el tipo y la configuración del reactor así como de la hidrodinámica prevaleciente en él. Por ejemplo, la transferencia externa de masa constituye una resistencia muy significativa a la velocidad de reacción en un lecho fijo mientras en un lecho fluidizado puede tener un efecto poco significativo. La complejidad del patrón de flujo alrededor de una partícula suspendida en una corriente de fluido es considerable. Cuando esto se combina con las interacciones con otras partículas como se presenta en los lechos fijos, el problema de predecir velocidades locales de transferencia de masa no tiene solución. Por lo que las velocidades de transporte se han venido definiendo en términos de coeficientes globales o promedio de transferencia de masa (Smith, 1981).

La resistencia a la transferencia de masa se supone concentrada en una película de fluido estacionario alrededor de la partícula catalítica haciendo que exista una diferencia entre la concentración de los reactivos en la superficie de la partícula y la prevaleciente en el seno del fluido. La velocidad de transferencia de masa externa por unidad de área (N_i Kg/hm^2) se define en la ecuación 2-14:

$$N_i = K_m(C_b - C_s) \qquad 2\text{-}14$$

donde K_m es el coeficiente promedio de transferencia de masa (m/h), C_b es la concentración de la especie en el fluido y C_S es la concentración en la superficie del catalizador (kg/m^3).

Smith (1981) hace una recopilación de correlaciones empíricas de coeficientes globales de transferencia de masa para reactores con lechos empacados o fijos, lechos fluidizados y reactores con partículas en suspensión. En estas correlaciones el número de Sherwood ($K_m\rho/G$) se relaciona al número de Reynolds (d_pG/μ) y al número de Schmidt ($\mu/\rho D_i$). Donde ρ es la densidad del fluido (kg/m^3), G es el flujo de másico superficial (kg/m^2h), μ es la viscosidad del fluido (kgm/h) y D_i es la difusividad molecular de la especie (m^2/h) y d_p es el diámetro de la partícula (m).

Davidson y Harrison (1977) estudiaron sistemas con lechos fluidizados, estableciendo que en éstos, los procesos de transferencia de masa tienen un comportamiento intermedio entre el caso donde existe transferencia de masa entre una partícula aislada y sus alrededores y el caso de lechos fijos donde la fracción de huecos es baja y las interacciones con otras partículas son altas. De esta manera, la mayoría de las correlaciones de coeficientes de transferencia de masa para lechos fluidizados son modificaciones de las correlaciones para lechos fijos con alguna funcionalidad de la fracción de huecos en el lecho.

En los sistemas biológicos aerobios la etapa limitante del proceso de transformación generalmente es el transporte de oxígeno desde las burbujas de aire hasta el seno del medio de cultivo, en la literatura existen algunas correlaciones de coeficientes globales para el transporte de oxígeno. Para sistemas anaerobios con células inmovilizadas algunos autores han utilizado las correlaciones existentes para lechos fijos o lechos fluidizados en sistemas químicos. Godia y Col. (1987) en la modelación de un lecho empacado para la fermentación alcohólica de la glucosa por *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en esferas de carrageno utilizaron las correlaciones reportadas por Smith (1981) para un lecho fluidizado.

En sistemas líquidos con partículas en suspensión con agitación mecánica y una fase gaseosa que se burbujea, la transferencia de masa desde el líquido hasta la superficie del sólido puede estar limitada por la baja velocidad relativa entre los elementos del líquido y la partícula que transporta. Esto es especialmente cierto cuando se tienen partículas menores a 100μ. Levins y Glastonbury en 1972 (Smith, 1981) reportaron el número de Sherwood en función del número de Reynolds referido a la velocidad de agitación, el diámetro de la partícula y las propiedades reológicas del sistema.

2.2.3 TRANSPORTE INTERNO DE MASA Y ETAPA REACTIVA (MODELO).

En esta sección se plantea un modelo de difusión y reacción para la fermentación con células inmovilizadas en esférulas de soporte en un reactor tipo tanque agitado. En esta sección sólo se plantean las ecuaciones generales; en el capítulo siguiente se

particularizarán las ecuaciones para describir la fermentación propiónica. El volumen total del sistema (V_T) está constituido por el volumen de líquido V_L y la suma de volúmenes V_I de las esferas de radio R_o. Las concentraciones de los diferentes constituyentes en la fase líquida son diferenciados con el subíndice L, mientras las concentraciones dentro de la esférula con el subíndice I.

Para su análisis este sistema se divide en dos partes: esferas de soporte y caldo de fermentación (fluido global). En las esférulas de soporte con las células inmovilizadas, se plantean las ecuaciones de continuidad para el sustrato y los productos así como el crecimiento celular. En el fluido global se supone un mezclado perfecto siendo las propiedades uniformes en todo el fluido. Los cambios globales observados serán medidos en el fluido y estarán íntimamente ligados con las interacciones con el soporte.

Suposiciones en la construcción del modelo:

a) Se considera que en el inicio de la fermentación la distribución de las células en el soporte es uniforme y que en todo el tiempo de fermentación no se presenta liberación de células hacia el fluido.
b) Las esférulas de soporte se consideran perfectamente esféricas y de tamaño uniforme.
c) El transporte de sustratos y productos ocurre sólo en la dirección radial y es debida únicamente a procesos difusivos caracterizados por su difusividad efectiva en el soporte.
d) Los perfiles radiales de concentración de sustratos y productos en el interior de las esferas se consideran simétricos respecto al eje central y presentan una máximo o un mínimo en el centro de la esfera.
e) Se considera una agitación perfecta en el medio circundante, de manera, que se supone no existe una resistencia externa significativa, por lo que las concentraciones en la superficie son las mismas que en el fluido.

Se partió del modelo propuesto por Nakasaki y Col. (1989), el cual cuenta con dos conjuntos de ecuaciones. El primero de ellos está compuesto por ecuaciones diferenciales parciales que rigen el crecimiento de la biomasa y la distribución, consumo y producción de sustratos y productos en el tiempo y dentro del soporte sólido. El segundo está formado por ecuaciones diferenciales ordinarias que representan el comportamiento dinámico de las concentraciones de las especies en el medio líquido.

El balance de masa en un elemento diferencial de la esférula de soporte para cualquier sustrato o producto con concentración C (g/l) está dado por la ecuación 2-15. En ésta el término del lado izquierdo representa la acumulación en el tiempo de la especie. El

primero del lado derecho es el término difusivo que representa las entradas y salidas del componente hacia o desde el elemento diferencial regidas por la difusividad efectiva de la especie D_{CE} (m^2/h). El último término es el reactivo r_{CI} (Par, S, P, X_{BI}) donde Par es el conjunto de parámetros característico de la velocidad de reacción, S representa las concentraciones de los sustratos involucrados (g/l), P se refiere a la concentración de los productos de las reacciones microbiológicas y X_{BI} es la concentración de la biomasa inmovilizada (g/l). La ecuación 2-16 rige el crecimiento de la biomasa en el elemento diferencial:

En el soporte para un sustrato o producto:

$$\frac{\partial C_I}{\partial t} = D_{CE}\left(\frac{\partial^2 C_I}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial C_I}{\partial r}\right) \pm r_{CI}(Par, S, P, X_{BI}) \qquad 2\text{-}15$$

En el soporte para la biomasa:

$$\frac{\partial X_{BI}}{\partial t} = r_{XI}(Par, S, P, X_{BI}) \qquad 2\text{-}16$$

La ecuación 2-17 es la de continuidad para el componente C en el medio líquido. El miembro de la izquierda representa la variación de la concentración de la especie por unidad de tiempo en el medio líquido, el primer término de la derecha representa la variación total de la cantidad acumulada de la especie C en el conjunto de esférulas de soporte por unidad de tiempo, el segundo término es la cantidad total del componente C consumido (-) o producido (+) . La suma de estas dos cantidades es en realidad el flujo total del componente C del medio al soporte o viceversa por unidad de tiempo.

En el caldo de fermentación para un sustrato o producto:

$$\frac{dC_L}{dt} = -\frac{3V_I}{R_o^3 V_L}\int_0^{R_o} r^2 \frac{\partial C_I}{\partial t} dr \pm \frac{3V_I}{R_o^3 V_L}\int_0^{R_0} r^2 r_{CI}(Par, S, P, X_{BI}) dr \qquad 2\text{-}17$$

Las ecuaciones 2-18 y 2-19 representan el contenido inicial del componente C en la esférula y en el medio líquido respectivamente. La ecuación 2-22 representa la carga inicial de biomasa en las esférulas, la ecuación 2-20 representa la igualdad de la concentración del componente C en la superficie de la esférula con la concentración de C en el seno del líquido como consecuencia de la suposición de mezclado perfecto, por último la ecuación 2-21 es la ecuación de simetría radial de la concentración del componente C en el soporte.

Condiciones iniciales y de frontera:

$$C_I(t = 0, 0 \leq r \leq R_o) = C_0 \qquad 2\text{-}18$$

$$C_L(t = 0) = C_{L0} \qquad 2\text{-}19$$

$$C_I(t \geq 0, r = R_o) = C_L(t) \qquad 2\text{-}20$$

$$\partial C_I(t \geq 0, r = 0)/\partial r = 0 \qquad 2\text{-}21$$

$$X_{BI}(t = 0, 0 \leq r \leq R_o) = X_{BIo} \qquad 2\text{-}22$$

2.3 CONSIDERACIONES EN LA ESTIMACIÓN DE LA CINÉTICA INTRÍNSECA PARA SISTEMAS CON CÉLULAS INMOVILIZADAS.

Varios modelos presentados para distintos sistemas inmovilizados tanto con células como con enzimas, utilizan expresiones cinéticas deducidas de datos obtenidos en experimentos con células libres o con enzimas en solución, pues suponen que bajo estas condiciones las variaciones observadas en las concentraciones de las especies se deben únicamente a la reacción microbiológica intrínseca sin efectos de transferencia de masa (Godia y Col., 1986; Nakasaky y Col., 1989; Melick y Col., 1987; Luong, 1985; Silbinger y Freeman, 1987).

Otros autores como Moynihan y Col. (1989) mencionan que las condiciones de los microambientes en los que las células son confinadas en los soportes difieren generalmente de las condiciones del líquido que las rodea. Los efectos de difusión, materiales del soporte, fuerza iónica, temperatura y otros factores juegan un papel importante en las cinéticas intrínsecas de las reacciones microbiológicas, tal que el comportamiento observado en células libres puede ser muy diferente al observado con células inmovilizadas. Tse y Col. (1987) en sus estudios de glucosa oxidasa y catalasa inmovilizada encontraron que el valor de las constantes de la ecuación de Michaelis Menten difieren significativamente de los estimados para el mismo sistema enzimatico en solución.

Kareal y Col. (1989) mencionan que en la estimación de los parámetros cinéticos en sistemas inmovilizados deben ser considerados los efectos de transferencia de masa porque éstos combinados con las velocidades de reacción determinan los perfiles radiales de concentración de sustratos y productos así como la distribución de la biomasa en la partícula de soporte. Estos autores estudiaron la inmovilización de *Pseudomonas putida*

(sistema aerobio) en fibra hueca de polietileno encontrando mediante la solución de las ecuaciones de reacción-difusión, que la biomasa se conglomeraba formando una película muy cerca a la superficie del soporte lo que fue corroborado experimentalmente por técnicas de autoradiografía de secciones del soporte.

Moynihan y Col. (1989) mencionan que en los experimentos realizados para obtener datos para la deducción de expresiones cinéticas y la estimación de sus parámetros se deben buscar las condiciones bajo las cuales las resistencias a la transferencia de masa tanto externas como internas puedan ser consideradas despreciables, sugiere el uso de reactores diferenciales en donde se varien las velocidades de flujo, reactores tipo tanque con agitación fuerte y uso de diferentes diámetros de partícula.

Tse y Col. (1987) proponen un método para determinar los parámetros cinéticos en sistemas inmovilizados. En este procedimiento primero se determinan los parámetros de transferencia de masa en condiciones bajo las cuales el efecto de la reacción no se presente o sea despreciable. Posteriormente se plantean las ecuaciones gobernantes del sistema que involucran tanto la transferencia de masa como las reacciones microbiológicas con sus parámetros desconocidos y mediante un análisis de regresión se estiman los valores de los parámetros que minimizan la diferencia de cuadrados entre los datos observados y los datos generados por el modelo. En este trabajo la estimación de parámetros se realizó siguiendo la técnica de Tse y Col. (1987).

2.4 ESTIMACIÓN DE LAS DIFUSIVIDADES EFECTIVAS.

En el transporte interno, las velocidades de difusión de las especies a través del soporte están influenciadas por la porosidad de la partícula, por la tortuosidad que es una medida de la complejidad de la forma e interconexiones entre los poros, y por la relación entre el diámetro promedio de los poros y el diámetro molecular de la especie que se difunde. Por estas razones tradicionalmente se ha generalizado el uso de difusividades efectivas que engloban el efecto de estos factores.

Estas correlaciones empíricas (Bailey y Ollis, 1986; Smith, 1981) son funciones de parámetros como el factor de tortuosidad, las fracciones de macroporos y microporos y sus radios, del radio molecular de la especie, de la difusividad molecular, etc. La mayoría de estos factores resultan dificiles de ser medidos por lo que algunos autores realizan la estimación partiendo de datos cinéticos donde se aíslan los procesos difusivos.

Melick y Col. (1987) y Tanaka y Col. (1989), presentaron un método para estimar las difusividades efectivas de la glucosa y etanol en esférulas de carrageno. Este consiste en suspender esférulas en una solución perfectamente agitada de las sustancias problema a las concentraciones prevalecientes en el reactor real así como otros componentes presentes en el caldo de fermentación. Después de suspender las esférulas, pequeñas muestras del medio son tomadas en intervalos pequeños de tiempo hasta alcanzar el equilibrio. Se registra el decremento en las concentraciones de las especies respecto al tiempo en la fase líquida. Para evaluar las difusividades efectivas se utiliza la solución del modelo transitorio de difusión en esferas suspendidas en una solución agitada de los componentes que se difunden. La solución de este modelo arroja perfiles radiales y la concentración en la solución (Variable medible) con respecto al tiempo, este modelo se resuelve para diferentes valores de difusividad efectiva hasta encontrar el valor que represente adecuadamente los datos experimentales recopilados.

Matsunaga y Col. (1980) proponen otro método para la determinación de difusividades efectivas en el cual dos recipientes están interconectados a través de una sección de sus paredes en donde se interpone una placa de soporte. En uno de los recipientes se coloca una solución con una concentración alta de substancia a la cual se le quiere determinar la difusividad efectiva, mientras en el otro recipiente se coloca otra solución con una concentración baja o sin nada. Los dos recipientes deben estar perfectamente agitados y se toman pequeñas muestras de ambas soluciones para seguir la variación en las concentraciones. La estimación de las difusividades efectivas se hace como en el método anterior es decir se plantean y resuelven las ecuaciones gobernantes hasta encontrar el valor de la difusividad que represente los datos experimentales.

2.5 FACTOR DE EFECTIVIDAD.

Melick y Col. (1987) mencionan que en orden de cuantificar el efecto de la difusión como limitante de la velocidad de consumo de sustrato en un sistema con células inmovilizadas es necesario separar los efectos de transferencia de masa de los efectos cinéticos. El método comúnmente aceptado es definir un factor de efectividad que se define como el cociente de la velocidad de consumo en presencia de difusión, (r_{real}), y la velocidad de consumo bajo las misma condiciones pero sin la presencia de los efectos de transferencia de masa, (r_{sup}), de acuerdo con la ecuación 2-23. De tal manera que un factor de efectividad cercano a la unidad implicaría que las limitaciones por transporte de masa fueran despreciables. El factor de efectividad está íntimamente relacionado al módulo de Thiele, que es un grupo adimensional que relaciona los parámetros característicos de las velocidades de reacción y de transferencia de masa así como características geométricas del soporte.

$$\eta = \frac{r_{real}}{r_{sup}} \qquad 2\text{-}23$$

Weisz (Smith, 1981) en muchos sistemas químicos encontró que para módulos de Thiele menores que 1/3 el factor de efectividad no es significativamente menor que la unidad. Luong (1985) para la fermentación alcohólica de la glucosa con Zymomonas mobilis inmovilizada en esferulas de K- Carrageno encontró que el factor de efectividad era muy cercano a la unidad hasta un modulo de Thiele de 20. Lee y Col. (1976) estudiaron la glucosa isomerasa inmovilizada en vidrio poroso encontrando que el factor de efectividad no era significativamente menor que la unidad hasta módulos de Thiele de 2.0. Bajo estos casos se puede visualizar que no existe un criterio general para establecer bajo que valor del módulo de Thiele el factor de efectividad no es significativamente menor que la unidad debiéndose principalmente a que la definición del módulo de Thiele depende de la expresión cinética y las variables adimensionales utilizadas.

El método comúnmente utilizado para determinar el factor de efectividad de un catalizador o biocatalizador, consiste en realizar experimentos con tamaños de catalizador cada vez más pequeños, hasta encontrar el tamaño en que la velocidad de reacción observada sea independiente del mismo. A este tamaño del catalizador se le fija un factor de efectividad igual a la unidad. Los factores de efectividad de los demás tamaños están entonces dados por el cociente entre las velocidades observadas para cada uno y la velocidad del catalizador con el factor de efectividad igual a la unidad (Smith, 1991). En este trabajo, ante la imposibilidad de elaborar esferas de soporte con tamaños significativamente diferentes, el factor de efectividad fue calculado utilizando la ecuación 2-23 y el modelo de reacción y difusión obtenido para representar la cinética observada de la fermentación con células inmovilizadas. Este método es válido, considerando que los estudios experimentales para caracterizar la etapa de transferencia de masa y la etapa reactiva se realizaron de forma independiente y posteriormente se conjuntaron para obtener el modelo de reacción y difusión. La estimación del factor de efectividad se define en el siguiente Capítulo.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

En este capítulo se presenta la descripción de los experimentos y sus resultados de las fermentaciones propiónicas con células libres e inmovilizadas en esferas de poligalacturonato de calcio en un reactor tipo tanque agitado y en un reactor tubular de lecho fluidizado. También se muestran los modelos matemáticos de las cinéticas observadas de las fermentaciones.

En este estudio de la fermentación con células libres se encontraron las condiciones de operación de máxima producción de ácido propiónico y se construyó el modelo de la cinética observada bajo estas condiciones. Aunque la orientación principal de este trabajo va enfocado hacia la fermentación con células inmovilizadas, el estudio con células libres sirvió de base para conocer la cinética intrínseca y las formas en que se relacionan el sustrato, los productos y el microorganismo, y la interacción de éstos con las condiciones del medio. Por otro lado el trabajar con células libres sirvió como punto de partida para conocer los distintos aspectos importantes del sistema de trabajo, como son el manejo y el cuidado del microorganismo, la preparación de los medios de cultivo, las rutinas de análisis, la estimación de los tiempos promedios de fermentación, entre otras cosas.

En la fermentación con células inmovilizadas en las esferas de poligalacturonato se construyeron dos modelos matemáticos del proceso de difusión y reacción. Estos modelos se diferencian por que en uno se supone que existe crecimiento celular en interior de la esfera mientras en el otro, se supone que existe un equilibrio entre el crecimiento y la mortandad de la biomasa de manera que ésta permanece constante. Este último modelo fue también utilizado para representar la cinética de la fermentación en un reactor tubular de lecho fluidizado en operación por lote y continua. Además se realizaron experimentos para conocer la cinética intrínseca y las difusividades efectivas de la lactosa y los ácidos propiónico y acético en las esferas de poligalacturonato de calcio. También se calculó el factor de efectividad para determinar la importancia de los procesos de transferencia de masa en las velocidades de reacción observadas.

3.1 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS LIBRES.

3.1.1 CONDICIONES DE OPERACIÓN DE MÄXIMA PRODUCCIÓN.

Se realizaron dos diseños experimentales secuenciales al presentado por Pérez (1997). Se consideró como variable de respuesta la concentración de ácido propiónico alcanzada después de 60 horas de fermentación y como factores independientes la temperatura, el pH y el extracto de levadura. El porciento de inóculo fue mantenido constante en valor de 10 % por considerar que aumentarlo como lo recomienda Pérez

(1997) deja de tener interés práctico. Los factores en cada diseño fueron estudiados en dos niveles definidos en función de las direcciones de aumento en la concentración de ácido producido. Estas direcciones se determinaron en función del signo del efecto del factor definido éste como la diferencia observada en la variable de respuesta por el cambio en los niveles del factor promediada sobre los niveles de los otros factores (Montgomery, 1991).

Los efectos de los factores fueron calculados con la ecuación 3-1, donde Y_{sup} y Y_{inf} son los promedios de la concentración en el nivel superior e inferior respectivamente. Un signo positivo del efecto indica que la concentración aumenta hacia el nivel superior y un signo negativo indica un aumento hacia el nivel inferior. Los niveles superior e inferior se identifican por el valor numérico alto y bajo del factor respectivamente. Entre los diseños experimentales realizados se buscó la existencia de un cambio de signo en los efectos de los factores, lo que indicaría la posible presencia de un máximo en la producción en los niveles estudiados con respecto a ese factor.

$$Efecto = \bar{Y}_{sup} - \bar{Y}_{inf} \qquad 3\text{-}1$$

Las corridas experimentales fueron llevadas a cabo en un reactor tipo tanque cuyo diagrama se muestra en la Figura 3.1. Este reactor está construido en acero inoxidable con una capacidad total de 2.2 litros, el reactor está recubierto con una coraza concéntrica por la cual se recircula agua de calentamiento para mantener constante la temperatura en el reactor, esta agua es proveída por una tina con bomba de recirculación para control de temperatura. La agitación en el reactor se hace mediante un magneto ovular de 6.5 cm de largo que gira a 300 rpm, además el reactor cuenta con tres bafles para evitar la formación del vórtice. En la tapa del reactor existen cinco orificios circulares donde se adaptan un tubo buzo para el burbujeo de nitrógeno, un tubo para la dosificación de hidróxido de amonio concentrado como agente neutralizante, un tubo para la toma de muestra, un tubo para salida de gases, una escotilla para la adición del inóculo y una entrada para el sensor de pH y temperatura unido a un potenciómetro. La forma de montar el equipo auxiliar del reactor y el arranque de este se muestran en el Apéndice B-1.

El reactor se llena con 1800 ml de caldo de fermentación que se prepara a partir de lactosuero vacuno desproteínizado y enriquecido con extracto de levadura y sales minerales. La elaboración y formulación del caldo de fermentación están descritas en el Apéndice A-1. El reactor con el medio y sus accesorios son esterilizados durante 20 minutos a 121°C en una autoclave, posteriormente cuando se alcanza la temperatura de operación se adicionan 200 ml de inóculo (Apéndice A-4) de *Propionibacterium acidipropionici* CDBB 1048 con 36 horas de crecimiento a 33°C. El reactor es burbujeado durante 20 minutos con nitrógeno y entonces la corrida se da por iniciada. El pH es

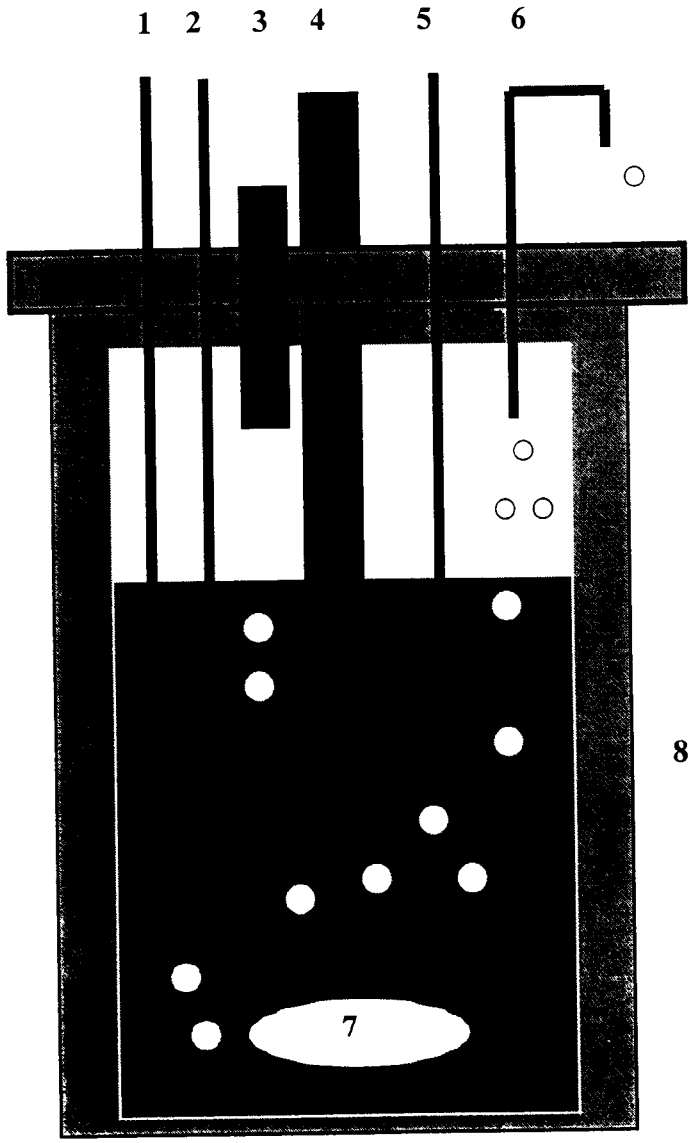


Figura 3.1 Reactor tipo tanque agitado. (1) Entrada de nitrógeno, (2)Entrada de neutralizante,(3) Entrada de inoculo,(4) Sensor de pH y Temperatura, (5) Toma de muestra, (6) Salida de gases, (7) Agitador y (8) Coraza

mantenido constante mediante la adición de hidróxido de amonio concentrado. Las fermentaciones se realizaron durante 60 horas, la toma de muestra, su manejo y sus respectivos análisis de ácidos (propiónico y acético), lactosa y biomasa se detallan en los Apéndices B-2, C-1, C-2 y C-3 respectivamente.

En la Tabla 3.1 se presentan las diferentes corridas con sus respectivas concentraciones alcanzadas de ácido propiónico tanto del diseño presentado por Pérez (1997) como las realizadas en este trabajo. También se muestran los efectos de los factores calculados para cada diseño. Si se observan los valores de los efectos se encontrarán los cambios de signos para cada uno de los factores estudiados.

La Figura 3.2 resume las respuestas promedio para cada nivel estudiado de la temperatura, el pH y la cantidad de extracto de levadura en el medio de cultivo. La respuesta promedio de un nivel se obtiene promediando todas las concentraciones de ácido propiónico obtenidas en las corridas realizadas a ese nivel, sin considerar los niveles de los otros factores. La producción de ácido propiónico respecto a la temperatura muestra un comportamiento similar al reportado por Quesada y Col. (1994), quienes encontraron que la producción se maximizaba en 37°C. También es importante mencionar que el efecto casi nulo que había encontrado Pérez (1997) entre las temperaturas de 25 y 35°C se maximiza con sólo un aumento de dos grados en la temperatura. De acuerdo a estas figuras la concentración de ácido propiónico tiende a maximizarse hacia una temperatura de 37°C, un pH de 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura en el caldo de cultivo. Sin embargo, si se revisan los resultados de la tabla 3.1 se puede encontrar que no en todas las corridas realizadas en al menos uno de los niveles señalados en la figura 3.2 como óptimos se tienen altas concentraciones de ácido propiónico, indicando este hecho la presencia de importantes interacciones entre los factores de estudio. Por ejemplo, la concentración de ácido propiónico alcanzada en el último diseño con un pH de 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura a 38.5 y 40°C son significativamente inferiores a la alcanzada a 37°C.

Considerando que la mayoría de los efectos de las interacciones entre los factores estudiados son importantes, la selección de las condiciones de operación optimas se debe hacer mediante un estudio de superficie de respuesta. Para esto se construyó un polinomio cúbico que correlaciona la concentración de ácido propiónico (P (g/l)) a la temperatura (T (°C)), el pH (pH) y la cantidad de extracto de levadura (EL (g/l)). En la construcción de este polinomio fueron consideradas todas las corridas de la tabla 3.1 a excepción de las que tienen un porciento de inoculación diferente al 10 %.

$$P = 62694.3 - 543.0506T - 28022.55pH - 21.045505EL - 0.549261T^2 + 4050.695pH^2 + 0.09494286EL^2 - 190.2359pH^3 + 0.1707843EL^3 + 194.2445TpH + 0.405367TEL + 1.458812ELpH - 16.17999TpH^2 - 0.03699607TEL^2 \qquad 3\text{-}2$$

Tabla 3.1 Diseños Experimentales.

Corrida	Temperatura (°C)	Unidades de pH	Extracto de levadura (g/l)	Inoculo (%v/v)	Acido Propiónico (g/l)
			***Diseño ½ 2^4**		
1	25	6.0	5.0	5.0	**17.44**
2	35	6.0	10.0	5.0	**18.69**
3	25	6.0	10.0	10.0	**14.77**
4	35	6.0	5.0	10.0	**19.20**
5	25	7.0	10.0	5.0	**12.56**
6	35	7.0	5.0	5.0	**12.02**
7	25	7.0	5.0	10.0	**19.80**
8	35	7.0	10.0	10.0	**15.89**
Efecto(g/l)	**0.30**	**-2.46**	**-1.63**	**2.23**	
			Diseño 2^3		
1	27	5.50	2.0	10	**14.79**
2	37	5.50	2.0	10	**13.57**
3	27	6.50	2.0	10	**12.74**
4	37	6.50	2.0	10	**27.18**
5	27	5.50	6.0	10	**13.08**
6	37	5.50	6.0	10	**31.05**
7	27	6.50	6.0	10	**16.84**
8	37	6.50	6.0	10	**36.52**
Efecto(g/l)	**12.74**	**5.2**	**7.3**	-	
			Diseño 2^2		
1	38.5	6.0	6.0	10.0	**25.76**
2	38.5	6.5	6.0	10.0	**27.52**
3	40.0	6.0	6.0	10.0	**22.65**
4	40.0	6.5	6.0	10.0	**20.55**
Efecto(g/l)	**-5.04**	**-0.18**	-	-	

*Diseño presentado por Pérez (1997)

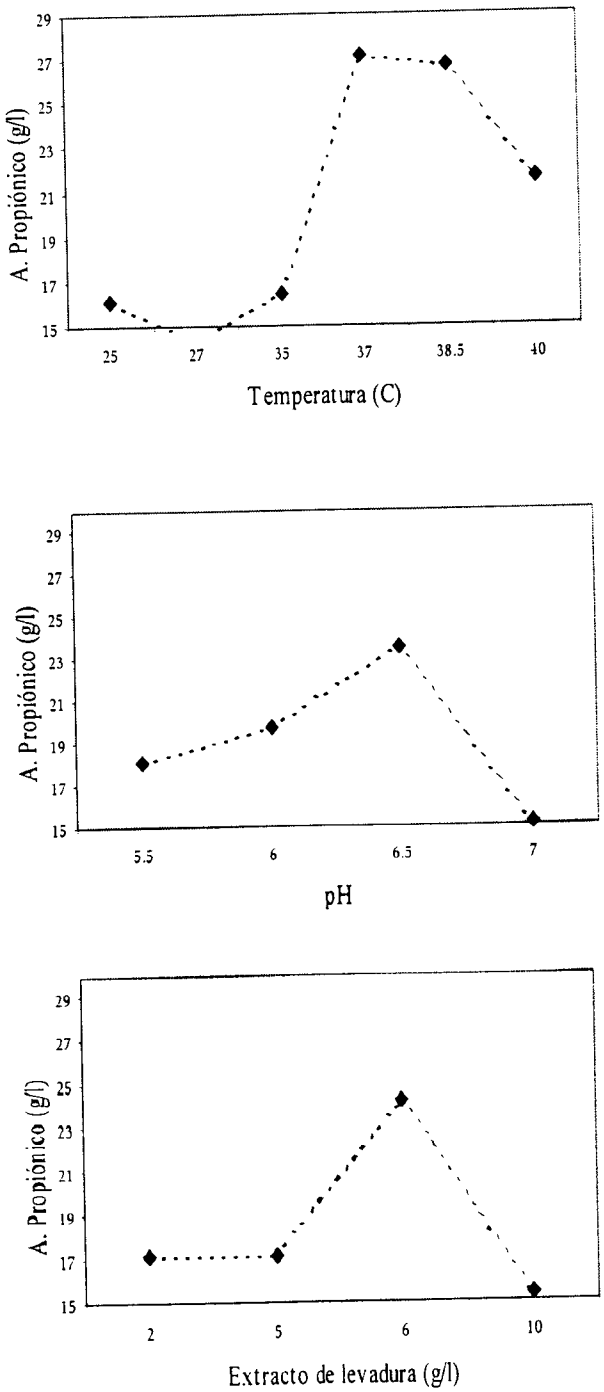


Figura 3.2 Efecto de la temperatura, el pH y el extracto de levadura sobre la concentración de ácido propiónico alcanzada en la fermentación propiónica del lactosuero.

Este polinomio tiene un factor de correlación de 0.995 y fue obtenido utilizando el paquete NCSS97, que automáticamente hace una búsqueda del punto con máxima producción. Las condiciones encontradas como optimas son 36.58°C de temperatura, 6.23 de pH y 5.6 g/l de extracto de levadura con una producción de ácido propiónico de 36.62 g/l. Si se observa esta combinación de condiciones de operación casi coinciden con las de la última corrida del segundo diseño de la tabla 3.1 y las observadas en la figura 3.2 es decir una temperatura de 37°C, un pH de 6.5 unidades y 6.0 g/l de extracto de levadura.

3.1.2 MODELO CINÉTICO.

En esta sección se presenta el modelo de la cinética de la fermentación propiónica con células libres, observada a 37°C, 6.5 de pH y 6.0 g/l de extracto de levadura en caldo de cultivo, condiciones de operación cercanas a los valores óptimos encontrados con el polinomio. El modelo fue propuesto considerando las relaciones observadas entre las velocidades experimentales de consumo, producción y crecimiento y estudiando las analogías encontradas con los modelos y los conceptos expuestos en el Capítulo 2. Los parámetros característicos del modelo fueron determinados con un procedimiento de regresión no - lineal de parámetros. Finalmente el modelo fue estudiado estadísticamente para determinar si era adecuado para representar los datos experimentales considerados.

Para seguir la cinética de la fermentación bajo las condiciones de estudio, se hicieron dos corridas, realizadas bajo la misma metodología experimental descrita en la sección anterior, tomando muestras cada cinco horas para el análisis de lactosa, ácidos propiónico y acético y biomasa. En el Apéndice E-1 se presentan los datos experimentales obtenidos y que fueron considerados en la construcción del modelo.

En la Figura 3.3 se presentan las velocidades de reacción experimentales promedio para la lactosa, la biomasa y los ácidos propiónico y acético, calculadas de acuerdo a incrementos, utilizando los datos promedios del Apéndice E-1. Como se observa las curvas son similares y todas presentan un máximo; sin embargo, las correspondientes a las velocidades de producción de los ácidos propiónico y acético están desfasados en el tiempo de los de lactosa y biomasa. Las curvas de velocidad de consumo y producción de la lactosa y de los ácidos, respectivamente, presentan tanto una fase asociada como una no asociada al crecimiento de biomasa siendo la primera la más extensa, también se observa una relación de proporcionalidad entre el consumo y la producción. La curva de velocidad de crecimiento de biomasa se observa que tiende a cero aun cuando la lactosa no se ha terminado, lo cual seguramente se debe a la inhibición por ácido propiónico. Esta curva presenta también valores negativos que corresponden a una etapa de mortandad o de fase endógena. Bajo estas características la fermentación propiónica puede clasificarse como una reacción microbiana del Tipo 2 y los ácidos se pueden considerar como metabólitos mixtos.

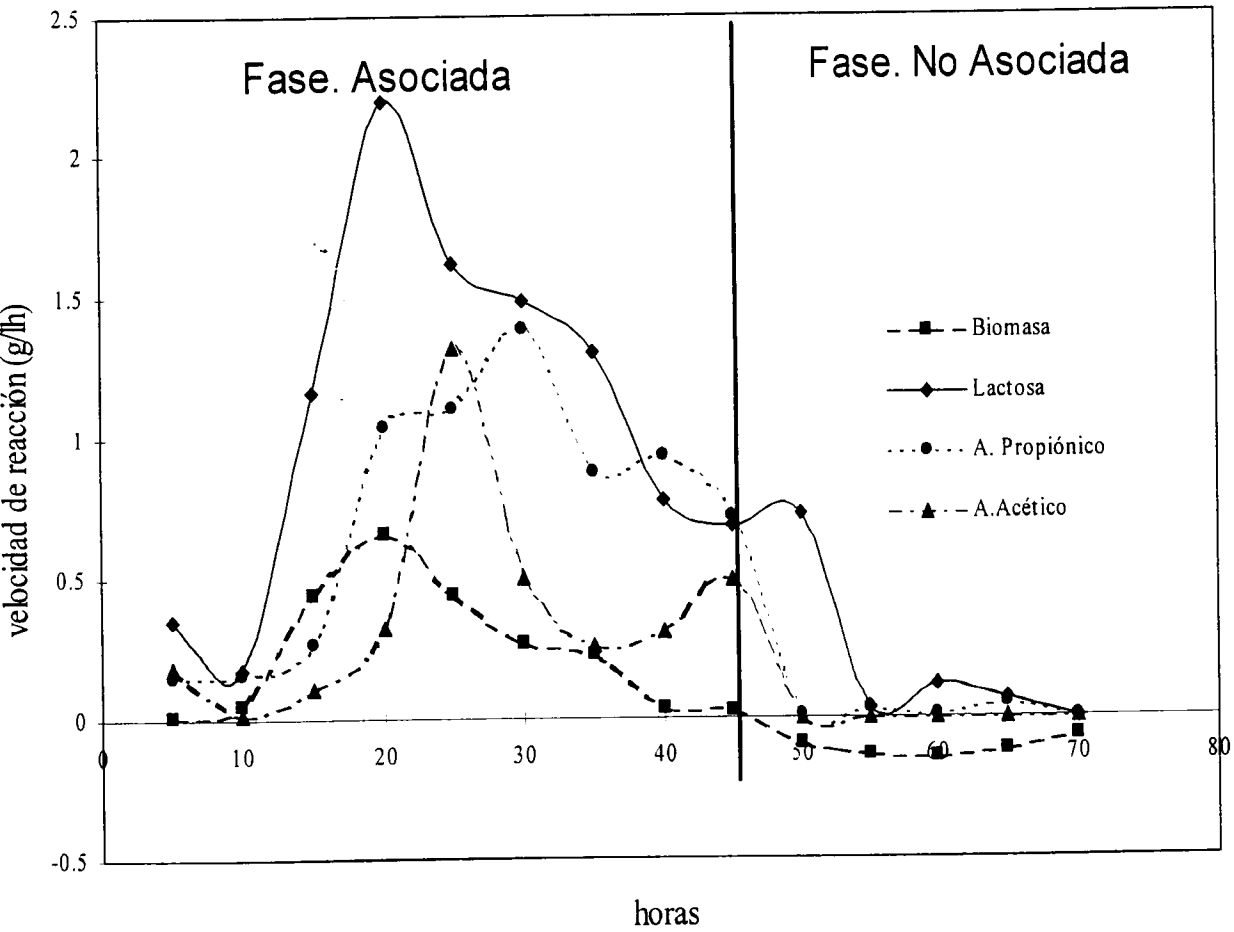


Figura 3.3. Velocidades de reacción experimentales para la biomasa, la lactosa, el ácido propiónico y el ácido acético.

Bajo las observaciones anteriores se proponen las siguientes premisas para la construcción del modelo descrito por las ecuaciones 3-3 a 3-6:

a) Se propone que el crecimiento de biomasa siga el modelo de Monod modificado con un término de inhibición por producto y un término adicional que represente a la etapa de mortandad.
b) Se propone que la ecuación de consumo de lactosa esté constituida por un término asociado al crecimiento de biomasa y un término no asociado.
c) Se considera que la producción de los ácidos propiónico y acético están asociadas directamente al consumo de lactosa.

Para la biomasa (X_B):

$$\frac{dX_B}{dt} = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} - K_d X_B \qquad 3\text{-}3$$

Para la lactosa (S):

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{S/X}\left(\mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P}\right) - mX_B \qquad 3\text{-}4$$

Para el ácido propiónico (P):

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S}\left(Y_{S/X}\left(\mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P}\right) + mX_B\right) \qquad 3\text{-}5$$

Para el ácido acético (A):

$$\frac{dA}{dt} = Y_{A/S}\left(Y_{S/X}\left(\mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P}\right) + mX_B\right) \qquad 3\text{-}6$$

donde X_B es la concentración de biomasa expresada como peso seco (g/l); S, P y A son las concentraciones (g/l) de la lactosa, el ácido propiónico y el acético, respectivament; μ_{MAX} es la tasa específica de crecimiento máxima (1/h); K_S la constante de saturación del sustrato (g/l); K_P la constante de inhibición por producto (g/l); K_d la constante de mortandad (1/h); m constante de mantenimiento (1/h); $Y_{S/X}$ coeficiente de consumo asociado al crecimiento (adimensional); $Y_{P/S}$ coeficiente de producción de ácido propiónico respecto al consumo de lactosa (adimensional) y $Y_{A/S}$ coeficiente para el ácido acético (adimensional).

Este sistema de ecuaciones fue resuelto y sus parámetros característicos fueron estimados utilizando el programa de cómputo CL3765.FOR (Apéndice D-1) que usa el

método de Runge Kutta de cuarto orden para resolver el sistema de ecuaciones y hace la estimación de los parámetros interactuando con la subrutina de regresión no-lineal GREG (Stewart y Col., 1990) de acuerdo al algoritmo que se muestra en la Figura 3.4.

Los valores estimados para los parámetros se muestran en la Tabla 3.2. En la Figura 3.5 se presentan los datos experimentales y las curvas calculadas de acuerdo al modelo propuesto y a los parámetros estimados. Mientras en la Figura 3.6 se presentan los residuales entre los datos experimentales y los datos teóricos, calculados de acuerdo a la ecuación 3-7. En esta figura el error experimental se representa como un intervalo alrededor de la línea del cero, limitado con dos barras discontinuas, cuyos limites están dados por más menos la desviación estándar calculada a partir de las repeticiones de los datos experimentales del Apéndice E-1.

$$\mathrm{Re}sidual = Exp_i - Cal_i \qquad 3\text{-}7$$

donde Exp_i es un dato experimental promedio y Cal_i es un dato calculado con el modelo.

Tabla 3.2 Parámetros estimados del modelo sin términos de retraso.

Parámetro	Valor
μ_{MAX}	0.2200
K_S	25.0000
K_P	26.3150
K_D	0.0186
m	0.0001
$Y_{S/X}$	3.0219
$Y_{P/S}$	0.6108
$Y_{A/S}$	0.3269

Como se observa en la Figura 3.5 existe una falta de ajuste del modelo, principalmente, en las primeras 20 horas del tiempo de fermentación, que corresponden a la fase de lactancia y de arranque de la fase de crecimiento exponencial de la biomasa. Esto también se puede observar en la gráfica de residuales entre los datos calculados respecto a los experimentales (Figura 3.6). Estos defectos del modelo se deben principalmente, a que los términos de las ecuaciones no son capaces de representar el crecimiento de las curvas en el periodo correspondiente a la fase de lactancia donde el crecimiento, el consumo y la producción son casi nulos.

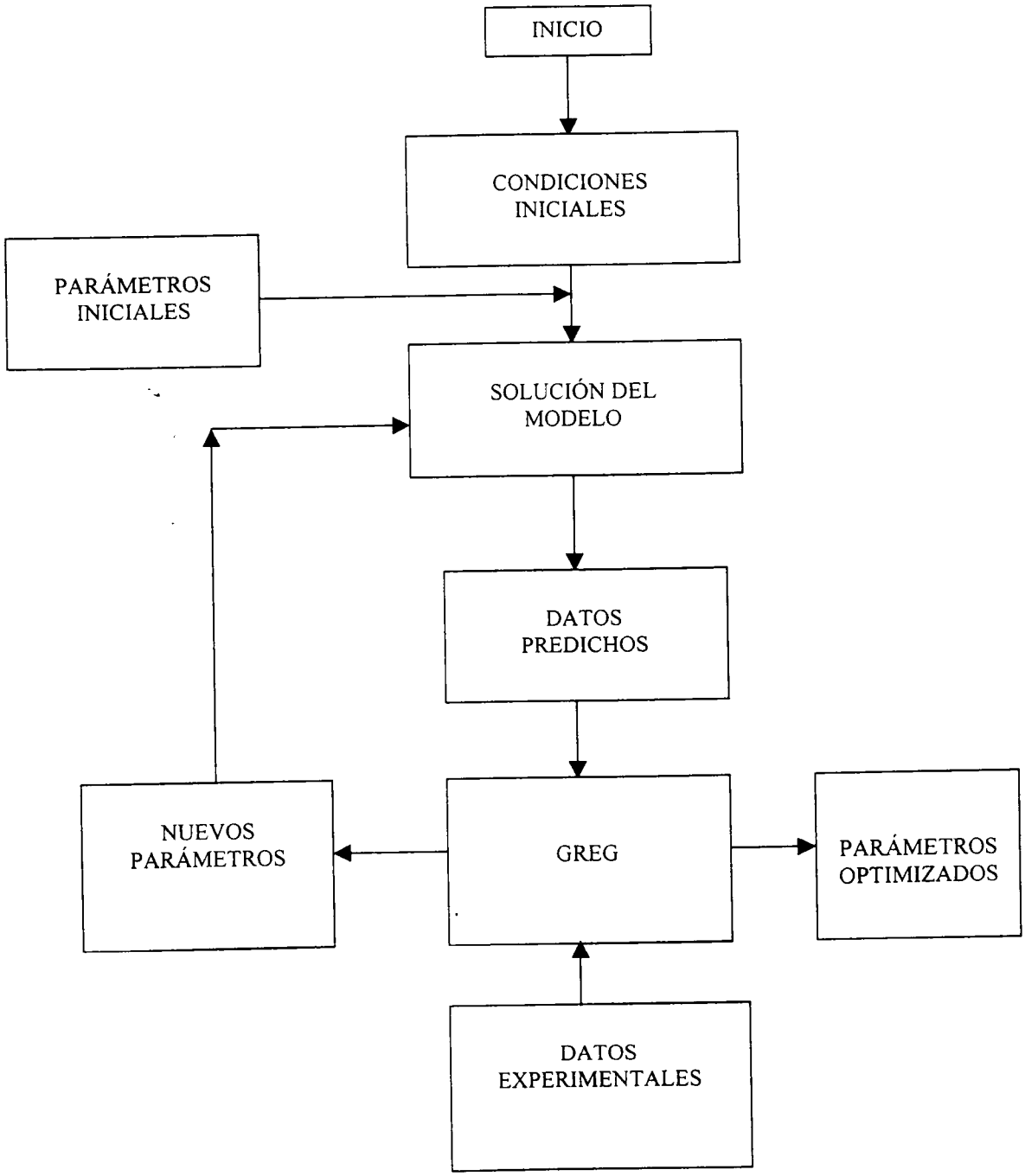


Figura. 3.4 Algoritmo del Programa CL3765.FOR para la optimización de los parámetros del modelo de la cinética de la fermentación con células libres descrito por las ecuaciones 3-3 a 3-6.

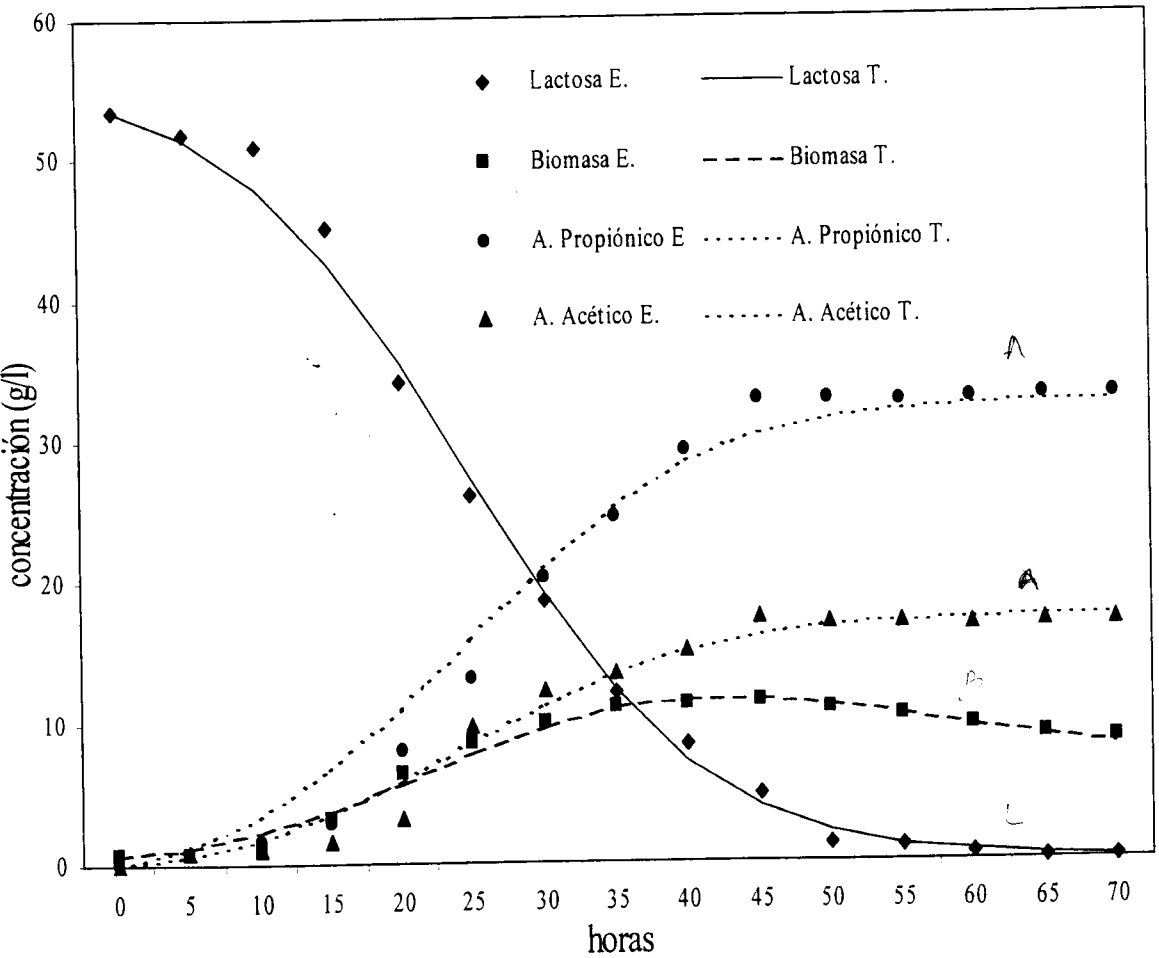


Figura 3.5. Cinética de la fermentación propiónica a temperatura de 37°C, pH de 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas.

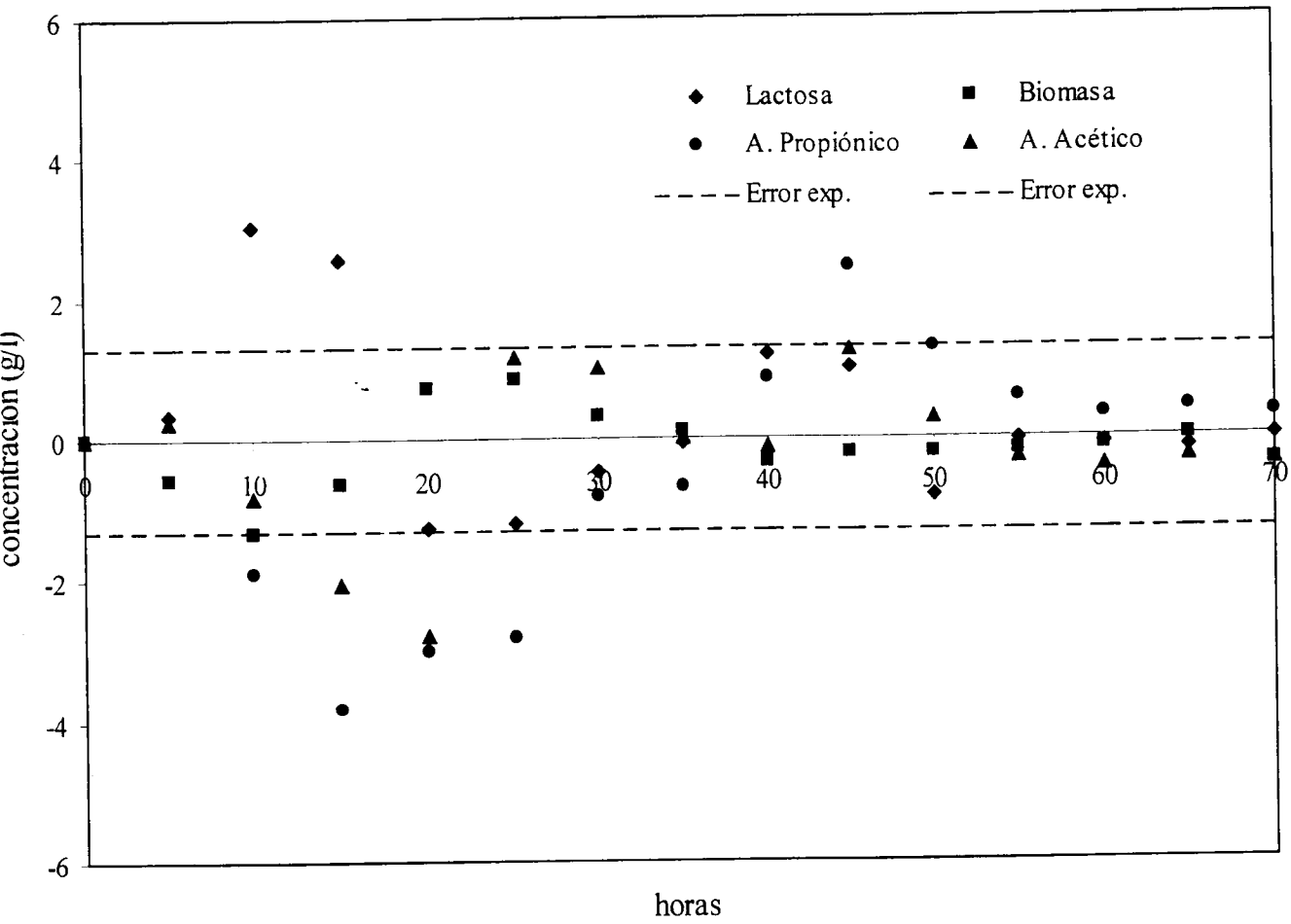


Figura 3.6 Residuales de los datos experimentales respecto a las predicciones del modelo.

Se estudiaron algunas modificaciones al modelo; como el uso de la ecuación 2.11, que es una modificación de la expresión de Monod, en donde el denominador presenta un término cuadrático del sustrato, haciendo que la concentración alta del sustrato al inicio de la fermentación tenga un efecto inhibitorio grande en el crecimiento de biomasa y que posteriormente disminuye junto con la concentración del sustrato. Otra modificación estudiada fue sustituir el parámetro K_S por un polinomio cúbico como función de la concentración de la lactosa para darle mayor flexibilidad al modelo. Sin embargo estas modificaciones no representaban mejoras significativas.

Finalmente se estudió agregar un término empírico (término de retraso) a cada una de las ecuaciones con el objeto de modificar el crecimiento inicial de las curvas. Los términos adicionales propuestos se evalúan como funciones de la concentración de lactosa y son independientes entre ellos. El modelo escrito con estos nuevos términos se presenta a continuación:

Para la biomasa (X_B):

$$\frac{dX_B}{dt} = \mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} - K_d X_B - \alpha_X S^{\beta X} \qquad 3\text{-}8$$

Para la lactosa (S):

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{S/X} \left(\mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \right) - mX_B + \alpha_S S^{\beta S} \qquad 3\text{-}9$$

Para el ácido propiónico (P):

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} \left(Y_{S/X} \left(\mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \right) + mX_B \right) - \alpha_P S^{\beta P} \qquad 3\text{-}10$$

Para el ácido acético (A):

$$\frac{dA}{dt} = Y_{A/S} \left(Y_{S/X} \left(\mu_{MAX} \frac{SX_B}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \right) + mX_B \right) - \alpha_A S^{\beta A} \qquad 3\text{-}11$$

donde α_X, α_S, α_P, α_A y β_X, β_S, β_P, β_A son los parámetros de los términos de retraso para la biomasa, la lactosa y los ácidos propiónico y acético respectivamente. En la Tabla 3.3 se presentan los parámetros estimados para este modelo. Mientras que en las Figuras 3.7 y 3.8 se presentan los datos de concentración experimentales y los calculados para cada especie.

Tabla 3.3 Parámetros estimados del modelo con retraso.

Parámetro	Valor
μ_{MAX}	0.2200
K_S	8.7976
K_P	12.9282
K_D	0.0178
m	1.8E-06
$Y_{S/X}$	2.9132
$Y_{P/S}$	0.7565
$Y_{A/S}$	0.4384
α_X	0.0142
α_S	0.0033
α_P	0.0132
α_A	0.0592
β_X	0.4017
β_S	1.0000
β_P	0.8573
β_A	0.8182

Como puede observarse en las Tablas 3.2 y 3.3 existen diferencias significativas en los valores de los parámetros debiéndose a la inclusión de estas constantes que necesariamente involucran un reacomodo de los valores iniciales. En la Figura 3.7 se observa que el nuevo modelo mejora el ajuste a los datos experimentales principalmente en la etapa inicial de la fermentación que corresponde a la fase de lactancia del crecimiento de la biomasa. En la gráfica de residuales se observa que la mayoría de éstos caen dentro del intervalo del error experimental. Los datos de lactosa son los que tienen mayor dispersión, observándose también que el comportamiento de los residuales para la biomasa es similar al observado con el modelo anterior, sin embargo, los residuales para los ácidos presentan un menor grado de dispersión.

Es importante observar que en los dos modelos la constante de mantenimiento m, que es el parámetro característico del consumo y de la producción no asociados al crecimiento, toma valores pequeños, indicando que éstos se dan principalmente como asociadas al crecimiento de biomasa. Esto es congruente a las mediciones experimentales pues como se puede observar en las Figuras 3.5 ó 3.7 en el desarrollo de la biomasa la etapa

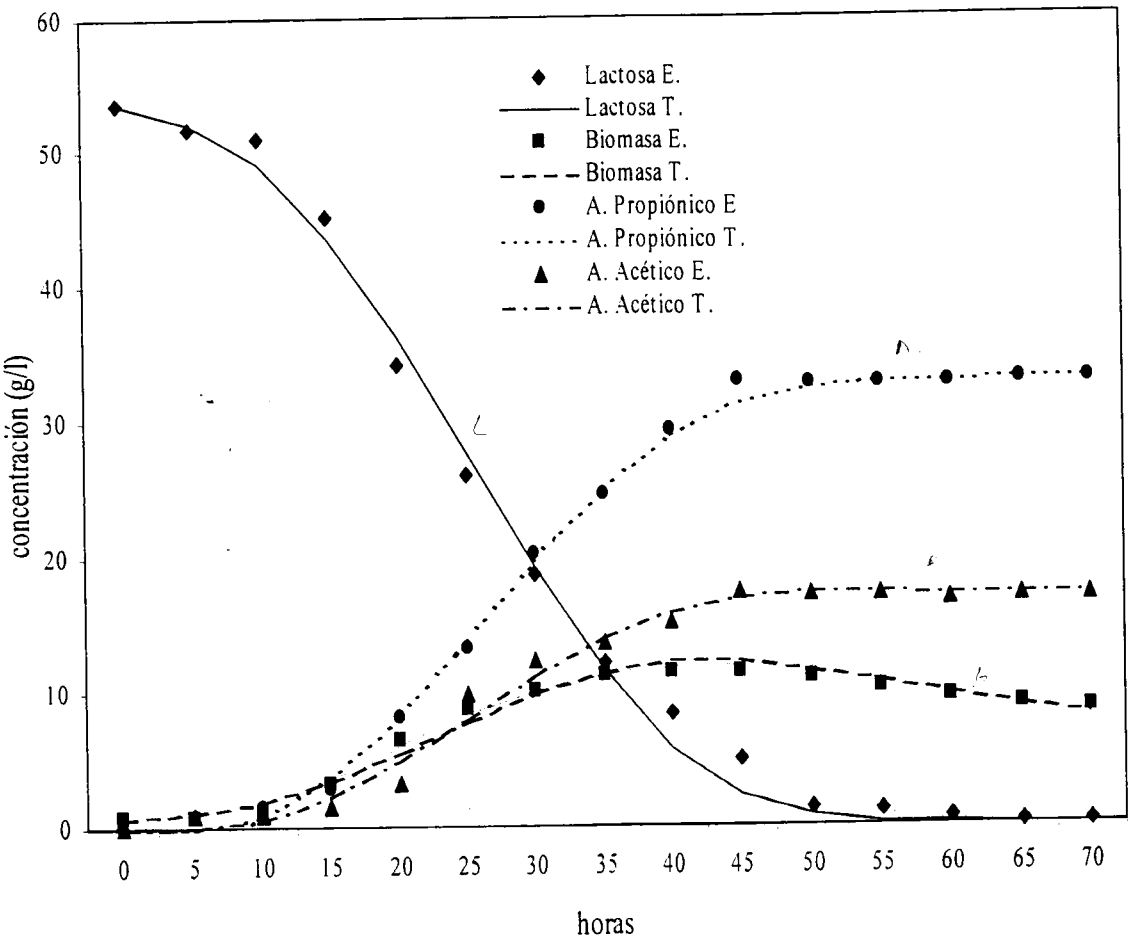


Figura 3.7. Cinética de la fermentación propiónica con células libres a temperatura de 37°C, pH de 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas del modelo con términos de retraso.

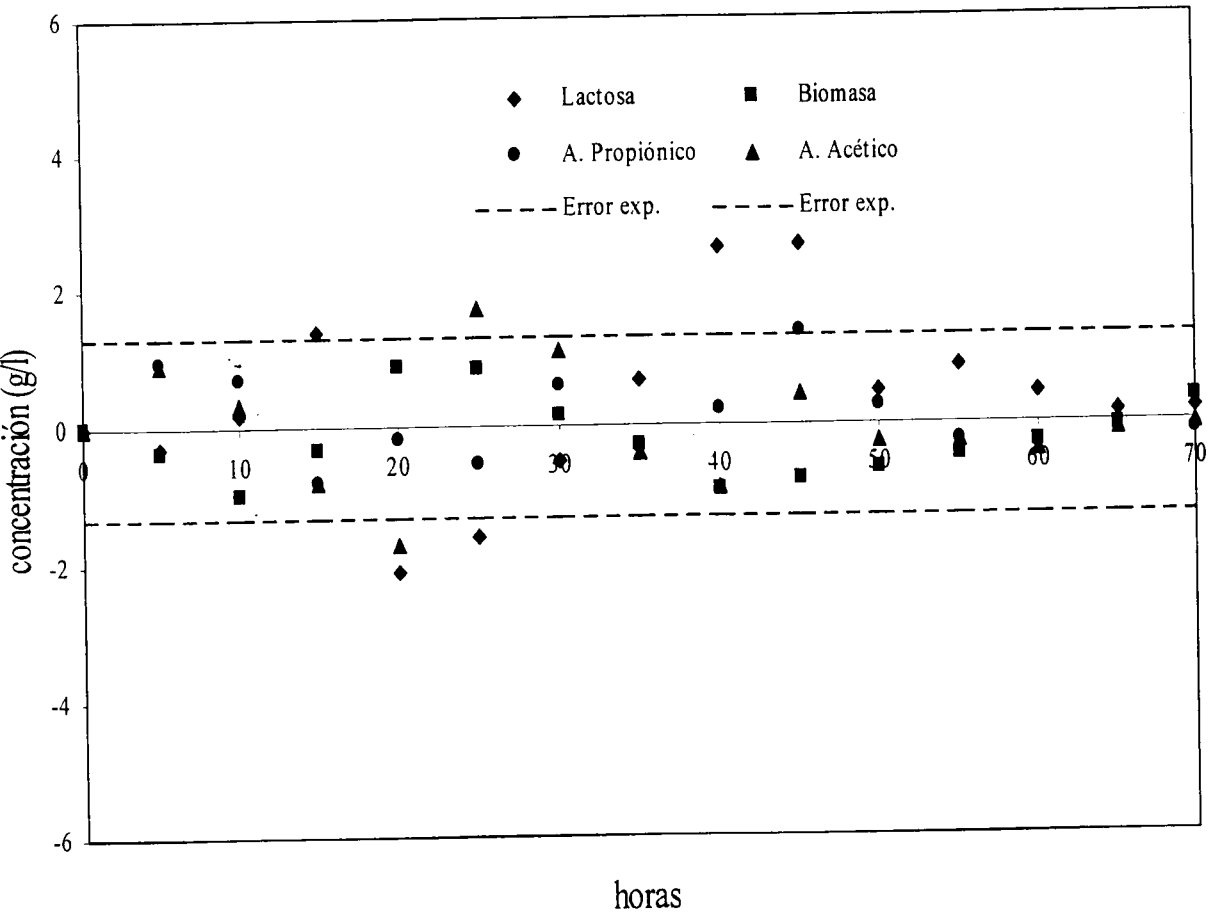


Figura 3.8 Residuales de los datos experimentales respecto a las predicciones del modelo con términos de retraso.

de mortandad es casi inmediata a la etapa de crecimiento exponencial y la etapa estacionaria parece ser corta. De esta manera la producción de ácidos que se sucede posteriormente al crecimiento exponencial de biomasa puede estar asociada también al crecimiento, pues este se puede dar aunque no se manifieste porque la velocidad de mortandad supere la decrecimiento de la nueva biomasa.

3.1.2.1 PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE.

Una manera de calificar si un modelo representa adecuadamente una serie de datos experimentales es realizar una prueba de falta de ajuste (Constantinides, 1987). Esta prueba consiste en hacer una comparación del cociente entre la varianza de los datos calculados respecto a los datos experimentales (varianza de falta de ajuste) y la varianza experimental (error experimental) con un parámetro estadístico establecido bajo un nivel de significancia dado. Los cálculos necesarios para obtener las varianzas se resumen en la Tabla 3.4. En esta tabla n es el número de repeticiones, p es el número de puntos experimentales de la variable independiente, k es número de parámetros del modelo, $\bar{y}_i$ es el promedio de las n repeticiones, y_i es un dato teórico, y^*_{ij} es un dato experimental, ν_1 y ν_2 son los grados de libertad para la varianza por falta de ajuste (S_1^2) y para el error o la varianza experimental (S_2^2) respectivamente. Las varianzas se calculan dividiendo la suma de cuadrados entre sus grados de libertad correspondientes.

Tabla 3.4 Análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza
Falta de ajuste	$\sum_{i}^{p} n_i(\bar{y}_i - y_i)^2$	$\nu_1 = p - k$	S_1^2
Error experimental	$\sum_{i}^{p}\sum_{j}^{n_i}(y^*_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\nu_2 = \left(\sum_{i}^{p} n_i\right) - p$	S_2^2

El criterio que se debe considerar para que el modelo pase la prueba de falta de ajuste esta dado por la ecuación 3-12:

$$\frac{S_1^2}{S_2^2} \leq F_{1-\alpha(\nu_1,\nu_2)} \qquad 3\text{-}12$$

donde F es parámetro característico de una distribución de probabilidad, α es el nivel de significancia para la prueba. De acuerdo a esta ecuación si la relación entre las varianzas es menor que el parámetro F para ese nivel de significancia, la variabilidad entre los datos

teóricos y los datos experimentales no es significativa ya que esta se puede considerar como la propia de unos datos normalmente distribuidos. O bien se puede interpretar que la variabilidad por falta de ajuste cae dentro de la propia variabilidad experimental y que por lo tanto el modelo representa adecuadamente los datos experimentales.

En la Tabla 3.5 se muestran las varianzas calculadas con las dos repeticiones de la corrida y los datos teóricos generados con los dos modelos (Apéndice E-1) . Para un nivel de significancia de 0.05 (recomendado por Mongotmery, 1991) y con los grados de libertad de la Tabla 3.5 se encontró en una tabla de distribución de probabilidad F, un valor para F de aproximadamente 1.6125, por lo que si se hace una comparación con las relaciones entre las varianzas de la Tabla 3.5 se puede concluir que solo el modelo con términos de retraso logra cumplir el criterio de la ecuación 3-12 y que por lo tanto representa adecuadamente los datos experimentales.

Tabla 3.5 Análisis de varianza para los modelos con células libres.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	$\frac{S_1^2}{S_2^2}$
Modelo sin retraso	181.59	52	3.4921	2.0964
Modelo con retraso	97.67	44	2.2198	1.3326
Error experimental	88.29	53	1.6658	

En la Tabla 3.6 se resumen las contribuciones a la suma de cuadrados para los dos modelos. En el modelo original (modelo sin retraso) se observa que la fuente principal de variación se distribuye principalmente entre las predicciones para la lactosa y los ácidos propiónico y acético, mientras que en el modelo con términos de retraso la contribución principal a la suma de cuadrados está en las predicciones de lactosa presentándose una disminución significativa en la falta de ajuste para los ácidos.

Tabla 3.6 Contribuciones a la suma de cuadrados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados Modelo sin retraso	% de contribución Modelo sin retraso	Suma de cuadrados Modelo con retraso	% de contribución Modelo con retraso
Lactosa	47.71	26.27	56.96	58.33
Biomasa	8.69	4.79	10.50	10.75
A. Propiónico	91.16	50.21	9.30	9.52
A. Acético	34.01	18.73	20.90	21.40

3.2 FERMENTACIÓN CON CÉLULAS INMOVILIZADAS.
3.2.1 CINÉTICA INTRÍNSECA.

En esta sección se estudiará cómo el modelo cinético para células libres (ecuaciones 3-8 a 3-11), permite representar la cinética intrínseca en el modelo de difusión-reacción para el sistema con células inmovilizadas. Al igual que en la sección anterior se realizaron dos fermentaciones bajo las condiciones de estudio, y posteriormente se hizo una evaluación estadística del modelo. En el Apéndice E-2 se presentan los resultados experimentales de las dos corridas realizadas. La metodología experimental para llevar a cabo estas corridas es la misma que la descrita en la sección 3.1, pero manteniendo las condiciones de operación recomendadas por Herrera (1997): temperatura de 35°C; pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura en el caldo de cultivo.

Nuevamente los parámetros cinéticos fueron estimados utilizando el programa CL3765.FOR (Apéndice D-1). En la Tabla 3.7 se reportan los valores de los parámetros y en la Figura 3.9 se presentan los datos experimentales y las curvas calculadas del modelo mientras en la Figura 3.10 se muestran los residuales de los datos experimentales y los datos calculados.

Tabla 3.7 Parámetros del modelo a 35°C, 5.5 de pH y 2.5 g/l de extracto de levadura.

Parámetro	Valor
μ_{MAX}	0.1305
K_S	33.5000
K_P	4.6461
K_D	3.8E-04
m	0.0000
$Y_{S/X}$	6.6234
$Y_{P/S}$	0.8038
$Y_{A/S}$	0.2317
α_X	0.0077
α_S	0.0152
α_P	0.2657
α_A	0.0760
β_X	0.0426
β_S	0.0000
β_P	0.0330
β_A	0.0408

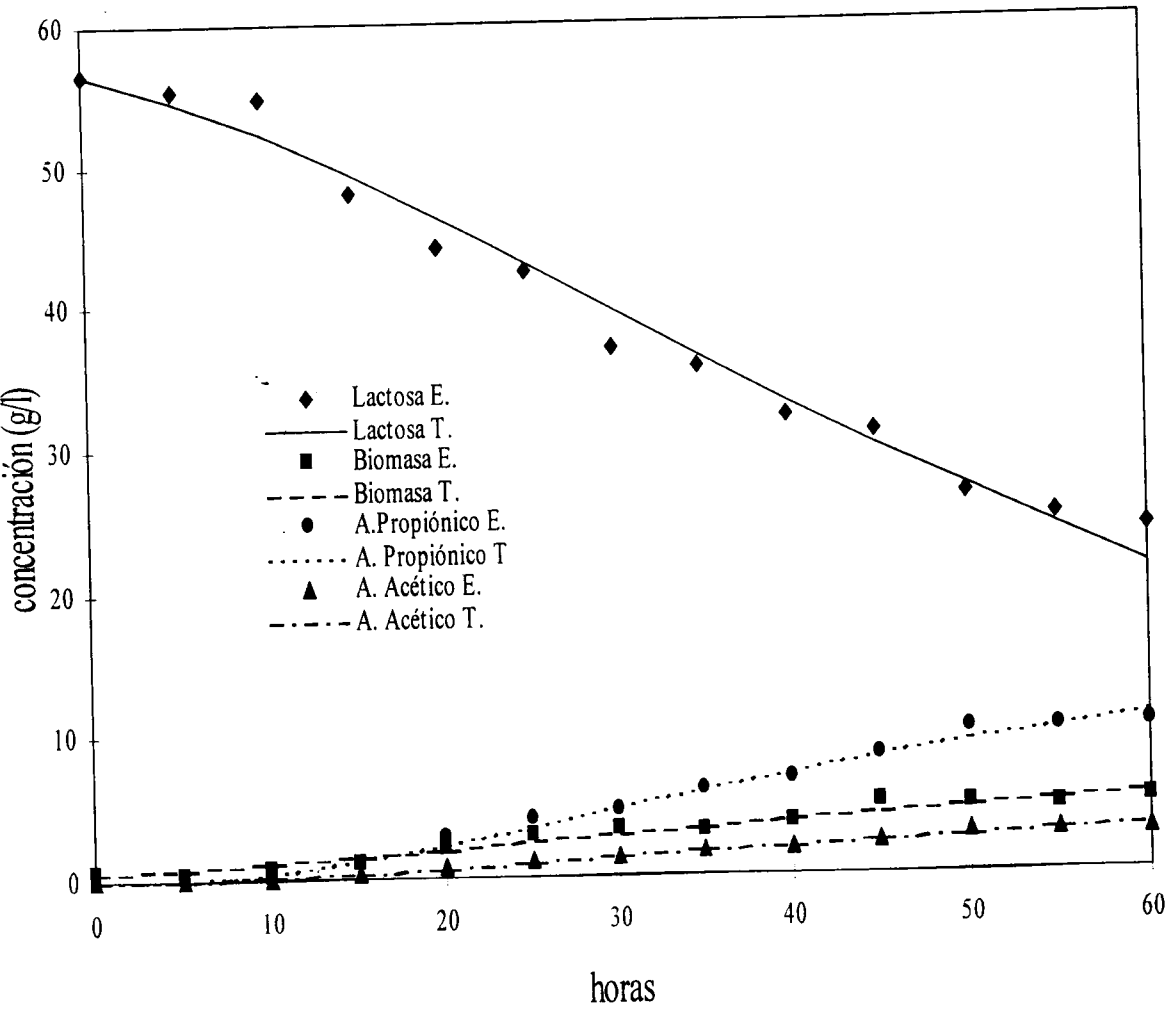


Figura 3.9. Cinética de la fermentación propiónica a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas

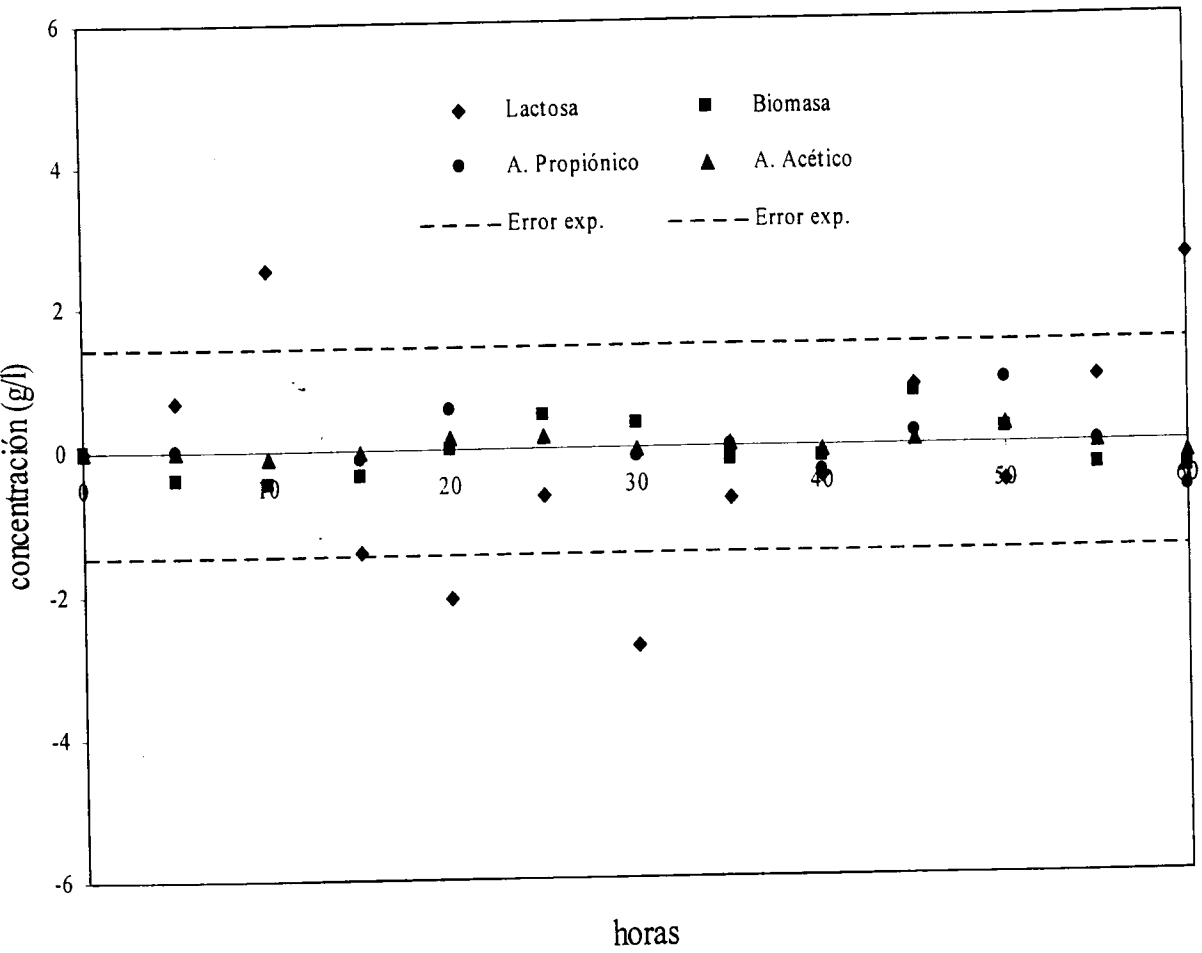


Figura 3.10. Residuales de los datos experimentales respecto a las predicciones del modelo.

Haciendo una comparación entre el comportamiento observado en esta fermentación y el estudiado en la sección anterior, se puede observar que existen menores velocidades de consumo y producción, debiéndose esto a que las condiciones de operación utilizadas son más restrictivas del crecimiento celular (pH cercano a la inhibición del crecimiento y una cantidad escasa de extracto de levadura). Este comportamiento también fue reflejado en los valores estimados para los parámetros. La tasa específica de crecimiento máxima μ_{MAX} como principal parámetro del crecimiento de biomasa tomó un valor significativamente inferior al obtenido bajo las condiciones estudiadas en la sección anterior. También los valores de K_S y K_p implican efectos de inhibición en el crecimiento, más grandes que en el caso anterior. En general tanto las curvas teóricas como las tendencias experimentales muestran perfiles casi lineales de concentración contra tiempo con cambios de concavidad muy tenues. También es importante mencionar que a diferencia de la cinética anterior, en este caso, el inicio de la producción de ácidos presenta un defasamiento mayor en el tiempo.

En este caso los términos de retraso presentan un efecto mayor en la ecuación de producción del ácido propiónico. Es importante mencionar que los valores tomados por los coeficientes de producción $Y_{P/S}$ y $Y_{A/S}$ al igual que en la otra cinética estudiada pierden el sentido físico que se le había mencionado en el Capítulo 2 por la inclusión del término de retraso.

En la Figura 3.9 se puede observar un buen ajuste del modelo para los datos de la biomasa y los ácidos propiónico y acético, sin embargo nuevamente existe falta de ajuste para la lactosa. En la gráfica de residuales también se observa que los datos para la biomasa y los ácidos muestran poca dispersión de la línea del cero contrastando con los residuales de lactosa que sin embargo tienen una dispersión menor que en la sección anterior.

En la Tabla 3.8 se presentan la varianza por falta de ajuste y la varianza experimental calculadas con los datos reportados en Apéndice E-2. El cociente de las dos varianzas es inferior al valor de F leído de la tabla de distribución de probabilidad (F=1.4900) por lo que se concluye que este modelo representa adecuadamente la cinética observada. En la Tabla 3.9 se presentan las contribuciones a la suma de cuadrados, donde se observa que nuevamente la falta de ajuste para la lactosa acapara la mayor variabilidad.

Tabla 3.8 Análisis de varianza para el modelo a 35°C, 5.5 de pH y 2.5 g/l de extracto de levadura.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	$\frac{S_1^2}{S_2^2}$
Falta de ajuste	71.75	36	1.9930	0.9719
Error experimental	96.15	47	2.0458	

Tabla 3.9 Contribuciones a la suma de cuadrados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	% de contribución
Lactosa	62.96	87.51
Biomasa	3.43	4.77
A. Propiónico	5.21	7.24
A. Acético	0.35	0.49

3.2.2 ESTIMACIÓN DE LAS DIFUSIVIDADES EFECTIVAS.

Se usó el método de difusión en esferas para obtener las difusividades efectivas de la lactosa y los ácidos propiónico y acético en poligalacturonato de calcio con células inmovilizadas. Este método consiste en suspender esferas de soporte en una solución agitada del soluto que se difunde, seguir la cinética de difusión a través del tiempo y resolver las ecuaciones de transferencia de masa para distintas difusividades efectivas, hasta encontrar la que mejor represente los datos experimentales.

En el experimento realizado, se suspendieron 79 ml de esferas de soporte con un diámetro promedio de 2.8 mm en 200 ml de lactosuero enriquecido. Las esferas de soporte antes de iniciar los experimentos fueron lavadas repetidamente con una solución diluida de cloruro de calcio, para asegurar que el contenido de lactosa en éstas fuera despreciable. La solución con las esferas fue agitada con una barra magnética a aproximadamente 300 r.p.m.; el pH fue fijado en 5.5 unidades y la temperatura en 35°C. Se tomaron muestras de 1.5 ml cada minuto y posteriormente cada tres minutos.

Para el modelo de difusión en esferas se consideran las suposiciones mencionadas en la sección 2.2.3 en cuanto a los mecanismos de transporte de masa. Las ecuaciones del modelo están adimensionalizadas con las variables de las ecuaciones 3-13 a 3-15.

$$R = \frac{r}{R_0}; \quad \tau = \frac{D_{ES}t}{R_0^2}; \quad S_a = \frac{S}{S_0} \qquad \text{3-13 a 3-15}$$

En el soporte:

$$\frac{\partial S_{al}}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 S_{al}}{\partial R^2} + \frac{2}{R}\frac{\partial S_{al}}{\partial R} \qquad \text{3-16}$$

En el medio líquido:

$$\frac{dS_{aL}}{d\tau} = -3\frac{V_I}{V_L}\frac{\partial S_{al}}{\partial R}_{R=1} \qquad \text{3-17}$$

Condiciones de frontera e iniciales:

$$S_{aL}(\tau = 0.0) = S_{aL0} \qquad 3\text{-}18$$

$$S_{aI}(\tau = 0.0, 0.0 \leq R \leq 1.0) = 0.0 \qquad 3\text{-}19$$

$$S_{aI}(\tau \geq 0.0, R = 1.0) = S_{aL} \qquad 3\text{-}20$$

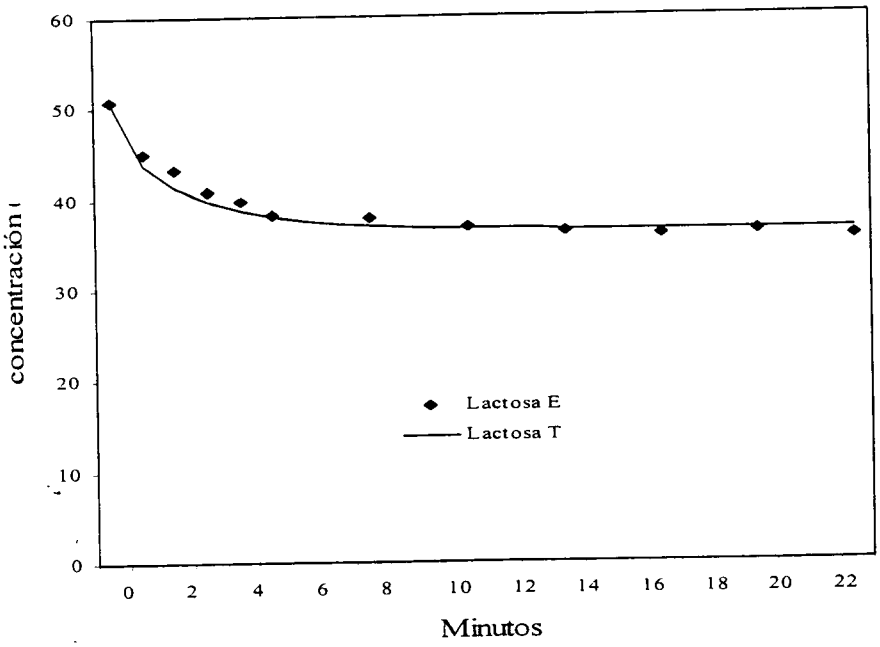
$$\frac{\partial S_{aI}}{\partial R}(R = 0.0) = 0.0 \qquad 3\text{-}21$$

El lado izquierdo de la ecuación 3-16 representa el término de acumulación de S en un elemento diferencial de la esfera mientras que los términos del lado derecho representan las velocidades de entrada y salida al elemento diferencial por unidad de tiempo regidas por la difusividad efectiva de la especie en el soporte. En la ecuación 3-17 el lado izquierdo representa la tasa de cambio de la concentración de S en el caldo de fermentación por unidad de tiempo que es igual a la tasa de cambio de la concentración de la especie en las esferas representado en el lado derecho de esta ecuación.

La ecuación 3-18 representa la concentración inicial de S en el caldo de fermentación. En la ecuación 3-19 se supone que en el interior de soporte en el tiempo inicial la concentración de S es prácticamente nula. La ecuación 3-20 representa la consideración de igualdad de concentración entre la superficie de la esfera y la prevaleciente en el caldo de fermentación. La ecuación 3-21 es la condición de simetría en los perfiles radiales de concentración.

Las ecuaciones del modelo fueron resueltas con el programa DIFF4.FOR (Apéndice D-2), que utiliza el método de diferencias finitas con discretización en las derivadas en el tiempo y el espacio. La difusividad efectiva estimada en este experimento para la lactosa es 2.1955 e-06 m^2/h, que es prácticamente la difusividad molecular reportada de lactosa en agua, 2.1707 e-06 m^2/h (Perry, 1992). Este resultado coincide con varios autores que han encontrado que para estos soportes las difusividades efectivas son muy cercanas a las difusividades moleculares en agua (Godia y Col., (1986); Karel y Robertson, (1989)), esto seguramente se debe al alto contenido de humedad en el soporte (92.0%). De igual forma fueron estimadas las difusividades efectivas para el ácido propiónico y el ácido acético, teniendo ambas una difusividad efectiva de 3.5528 e-06 m^2/h la cual comparada con la reportada del ácido acético en agua (Perry, 1992) tiene una diferencia del 17 %. En la Figura 3.11 se muestran los datos experimentales y las curvas calculadas para las cinéticas de difusión de la lactosa y los ácidos.

El hecho de que las difusividades efectivas estimadas sean muy similares a sus difusividades moleculares, implica que el comportamiento de una esfera de soporte sea como el de una esfera de agua confinada y que como elemento de fluido estuvo en contacto con todos los elementos de fluido no confinados y con las otras esferas de modo que la transferencia interfacial de masa no estuvo limitada por efectos externos como la mala agitación, velocidades relativas bajas entre los elementos del fluido y las esferas, interacciones entre las esferas que redujeran significativamente el área de transferencia de masa. Por esto bajo las condiciones de estudio las resistencias externas a la transferencia de masa pueden ser despreciables.



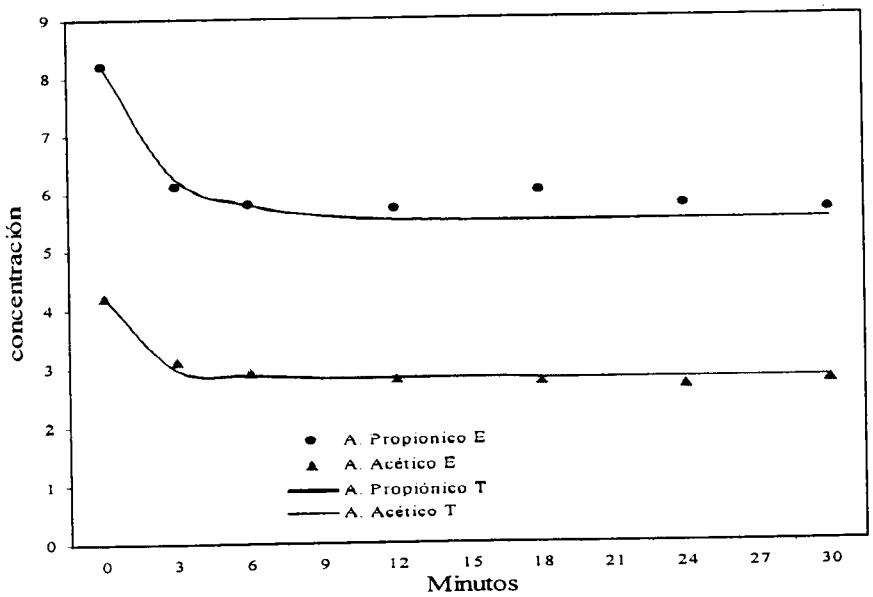


Figura 3.11. Cinética de difusión de la lactosa y de los ácidos propiónico y acético, hacia las esferas de soporte. Temperatura de 35°C y pH de 5.5. Datos experimentales y curvas calculadas.

3.2.3 CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN CON CÉLULAS INMOVILIZADAS.

En esta sección se desarrollaron dos modelos de reacción y difusión para representar la cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizas en un reactor tipo tanque. En el primer modelo se considera que existe crecimiento celular en el interior del soporte; mientras en el segundo modelo se considera que existe un equilibrio entre las velocidades de crecimiento y mortandad de la biomasa inmovilizada, de manera que la cantidad de está permanece constante. Con estos modelos se representaron los datos experimentales reportados por Herrera (1997).

3.2.3.1 MODELO CON CRECIMIENTO CELULAR EN EL SOPORTE.

El modelo en estudio está basado principalmente en suponer que en los microambientes internos del soporte las relaciones entre el sustrato y los productos con la biomasa inmovilizada son las mismas que las observadas en la fermentación con células libres. De manera que la cinética intrínseca de fermentación en este sistema se representó con las expresiones finales del modelo obtenido en la sección 3.1.2 (ecuaciones 3-8 a 3-11) y los valores de los parámetros de la Tabla 3.7. También se supone que el crecimiento celular o algún otro factor no afecta el valor de las difusividades efectivas anteriormente calculadas.

Las ecuaciones gobernantes del modelo que se presentan enseguida fueron escritas en forma adimensional con las variables que se definen a continuación:

$$\tau = \frac{D_{ES}t}{R_0^2}; \qquad R = \frac{r}{R_0}; \qquad S_a = \frac{S}{S_0}; \qquad P_a = \frac{P}{S_0}; \qquad Xa_B = \frac{X_B}{X_{B0}} \qquad \text{3-22 a 3-26}$$

A) En las esferas de soporte:

Para la biomasa:

$$\frac{\partial X_{aBI}}{\partial \tau} = \phi_1 \frac{S_0 S_{aI} X_{aBI}}{K_S + S_0 S_{aI}} \frac{K_P}{K_p + S_0 P_{aI}} - \phi_3 X_{aBI} - TR_X \qquad \text{3-27}$$

Para la lactosa :

$$\frac{\partial S_{aI}}{\partial \tau} = \left(\frac{\partial^2 S_{aI}}{\partial R^2} + \frac{2}{R}\frac{\partial S_{aI}}{\partial R} \right) - \phi_1 Y_{S/X} \frac{S_{aI} X_{aBI} X_{BI0}}{K_S + S_0 S_{aI}} \frac{K_P}{K_p + S_0 P_{aI}} - \phi_2 \frac{X_{aBI} X_{BI0}}{S_0} + TR_S$$

3-28

Para el ácido propiónico:

$$\frac{\partial P_{aI}}{\partial \tau} = R_D\left(\frac{\partial^2 P_{aI}}{\partial R^2} + \frac{2}{R}\frac{\partial P_{aI}}{\partial R}\right)$$

$$+ Y_{P/S}\left(\phi_1 Y_{S/X}\frac{S_{aI}X_{aBI}X_{BI0}}{K_S + S_0 S_{aI}}\frac{K_P}{K_p + S_0 P_{aI}} + \phi_2\frac{X_{aBI}X_{BI0}}{S_0}\right) - TR_P \qquad 3\text{-}29$$

donde:

$$R_D = \frac{D_{EP}}{D_{ES}} \qquad 3\text{-}30$$

$$\phi_1 = \frac{R_0^2 \mu_{MAX}}{D_{ES}} \qquad 3\text{-}31$$

$$\phi_2 = \frac{R_0^2 m}{D_{ES}} \qquad 3\text{-}32$$

$$\phi_3 = \frac{R_0^2 K_D}{D_{ES}} \qquad 3\text{-}33$$

$$TR_X = \frac{\alpha_X S^{\beta X} R_0^2}{D_{ES} X_{B0}} \qquad 3\text{-}34$$

$$TR_S = \frac{\alpha_S S^{\beta S} R_0^2}{D_{ES} S_0} \qquad 3\text{-}35$$

$$TR_P = \frac{\alpha_P S^{P} R_0^2}{D_{ES} S_0} \qquad 3\text{-}36$$

donde S_0 es la concentración inicial de lactosa en el caldo de fermentación (g/l); X_{B0} es la concentración o carga inicial de biomasa en el soporte (g/l); D_{ES} y D_{EP} son las difusividades efectivas de la lactosa y el ácido propiónico (m^2/h). Las ecuaciones 3-28 y 3-29 corresponden a formas particulares de la ecuación 2-15 del modelo de difusión y reacción del capitulo 2 para la lactosa y el ácido propiónico, respectivamente. En estas ecuaciones los términos reactivos están dados por los miembros del lado derecho de las ecuaciones 3-9 y 3-10 escritos en forma adimensional. La ecuación 3-27 corresponde a aquella que rige

el crecimiento de la biomasa en el interior de la esfera de soporte a través del tiempo escrita en forma adimensional (ecuación 3-8), pero debe entenderse que esta ecuación se define en un elemento diferencial del soporte y que por lo tanto depende de las concentraciones en el interior de éste.

Los grupos adimensionales ϕ_1, ϕ_2 y ϕ_3 así como los asociados a las constantes de retraso, TR_X, TR_S y TR_P, que están definidos en las ecuaciones 3-31 a 3-32 son comúnmente conocidos como módulos de Thiele. Estos grupos siempre se definen como el cociente entre los parámetros asociados a la velocidad de reacción y los asociados a la velocidad de transferencia de masa, que en este caso está dado por la difusividad efectiva de la lactosa.

B) En el caldo de fermentación:

Para la lactosa:

$$\frac{dS_{aL}}{d\tau} = -3\frac{V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \frac{\partial S_{aI}}{\partial \tau} dR - 3\frac{V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \left(\phi_1 Y_{S/X} \frac{S_{aI} X_{aBI} X_{BI0}}{K_S + S_0 S_{aI}} \frac{K_P}{K_p + S_0 P_{aI}} + \phi_2 \frac{X_{aBI} X_{BI0}}{S_0} - TR_S \right) dR \qquad 3\text{-}37$$

Para el ácido propiónico:

$$\frac{dP_{aL}}{d\tau} = -3\frac{V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \frac{\partial P_{aI}}{\partial \tau} dR + 3\frac{V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 Y_{P/S} \left(\phi_1 Y_{S/X} \frac{S_{aI} X_{aBI} X_{BI0}}{K_S + S_0 S_{aI}} \frac{K_P}{K_p + S_0 P_{aI}} + \phi_2 \frac{X_{aBI} X_{BI0}}{S_0} - TR_P \right) dR \qquad 3\text{-}38$$

Las ecuaciones 3-37 y 3-38 son particularizaciones de la ecuación 2-17 para la lactosa y el ácido propiónico, respectivamente. Estas ecuaciones, como ya se mencionó anteriormente, representan el balance de masa entre el caldo de fermentación y la totalidad de las esferas de soporte. En estas ecuaciones las tasas de cambio en las concentraciones de la lactosa y el ácido propiónico en el caldo de fermentación corresponden al flujo másico que entra ó sale del soporte por unidad de tiempo.

Para el caso de la lactosa, el flujo másico que entra del caldo de fermentación a las esferas de soporte corresponde a la suma de la cantidad acumulada y la consumida de lactosa dentro de las esferas por unidad de tiempo (primer y segundo término del lado derecho de la ecuación 3-37). El flujo másico del ácido propiónico que sale de las esferas

hacia el caldo de fermentación esta dado por la diferencia entre la cantidad producida y la acumulada dentro de las esferas por unidad de tiempo (segundo y primer término del lado derecho de la ecuación 3-38).

Condiciones iniciales y de frontera:

Para la lactosa:

$$S_{aI}(\tau = 0{,}0 \leq R \leq 1) = S_{aI0} \qquad 3\text{-}39$$

$$S_{aL}(\tau = 0.0) = S_{aL0} \qquad 3\text{-}40$$

$$S_{aI}(\tau \geq 0, R = 1) = S_{aL}(\tau) \qquad 3\text{-}41$$

$$\partial S_{aI}(\tau \geq 0, R = 0)/\partial R = 0 \qquad 3\text{-}42$$

Para el ácido propiónico:

$$P_{aI}(\tau = 0{,}0 \leq R \leq 1) = P_{aI0} \qquad 3\text{-}43$$

$$P_{aL}(\tau = 0.0) = P_{aL0} \qquad 3\text{-}44$$

$$P_{aI}(\tau \geq 0, R = 1) = P_{aL}(\tau) \qquad 3\text{-}45$$

$$\partial P_{aI}(\tau \geq 0, R = 0)/\partial R = 0 \qquad 3\text{-}46$$

Para la biomasa:

$$X_{aBI}(\tau = 0{,}0 \leq R \leq 1) = X_{aBIO} \qquad 3\text{-}47$$

Las ecuaciones 3-39 a 3-42 y 3-43 a 3-46 son análogas a las ecuaciones 2-18 a 2-21 que representan las condiciones iniciales y de frontera para las concentraciones de la lactosa y el ácido propiónico en el caldo de fermentación y en las esferas de soporte. La ecuación 3-47 representa la distribución inicial de biomasa en las esferas de soporte. En estas ecuaciones no se incluyeron las que involucran el ácido acético por simplificar la tarea de cómputo y considerando que, de acuerdo a lo reportado por Herrera (1997), las concentraciones de estos en la mayor parte del tiempo de fermentación guardan una relación aproximadamente constante (P/A≈4.0).

Este sistema de ecuaciones fue resuelto por método de líneas, que es una modificación del método de diferencias finitas, en el cual las ecuaciones diferenciales

parciales respecto a dos variables independientes son discretizadas en diferencias finitas sólo para una de las variables, con lo cual se genera un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias respecto a la variable no discretizada que puede ser resuelto por algún método numérico. Para este sistema, las ecuaciones parciales fueron discretizadas respecto a la coordenada radial generando un sistema de ecuaciones ordinarias respecto al tiempo que fue resuelto utilizando el método de Runge Kutta de cuarto orden. En la Figura 3.12 se muestra el algoritmo general de solución de este sistema de ecuaciones bajo el cual se construyó el programa CLCI3555.FOR (Apéndice D-3). En la representación cinética se usan los parámetros de la Tabla 3.7 con las difusividades efectivas estimadas en la sección anterior y considerando las condiciones de operación de la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Condiciones de operación.

Variable	Valor
Temperatura	35°C
PH	5.5
Extracto de Levadura	2.5 g/l
Carga de Biomasa	7.0 g/l
Volumen de esferas	250 ml.
Volumen de medio	1500 ml
Agitación	300 Rev/min.
Radio de las esferas	1.4078+/- 0.1532mm

En la Figura 3.13 se presenta los datos experimentales de Herrera (1997) y las curvas calculadas en este trabajo, observándose que las tendencias de ambos son similares pero existe una marcada diferencia en sus pendientes. Las tendencias de los datos experimentales muestran pendientes más grandes que las curvas teóricas por lo que supone una actividad metabólica más alta que la que se predice con el modelo utilizando la cinética y los parámetros obtenidos de la fermentación con células libres. También se puede observar que el modelo predice un crecimiento significativo de la biomasa dentro de la esfera, lo cual no concuerda con lo reportado por Herrera (1997), quien siguió el crecimiento microbiano a través de la fermentación dentro de las esferas, cuantificando éste como unidades formadoras de colonias en placa (UFC) por mililitro de soporte. En la Figura 3.14 se muestran sus resultados en los cuales se demuestra que el crecimiento promedio de biomasa es nulo.

Los términos asociados a las constantes de retraso fueron eliminados por considerar que bajo las condiciones de este sistema el consumo y la producción guardan una relación más directa. La estimación de los parámetros del modelo se realizó con el programa CLCI3555.FOR usando la subrutina GREG. Los nuevos valores de los parámetros se muestran en la Tabla 3.11.

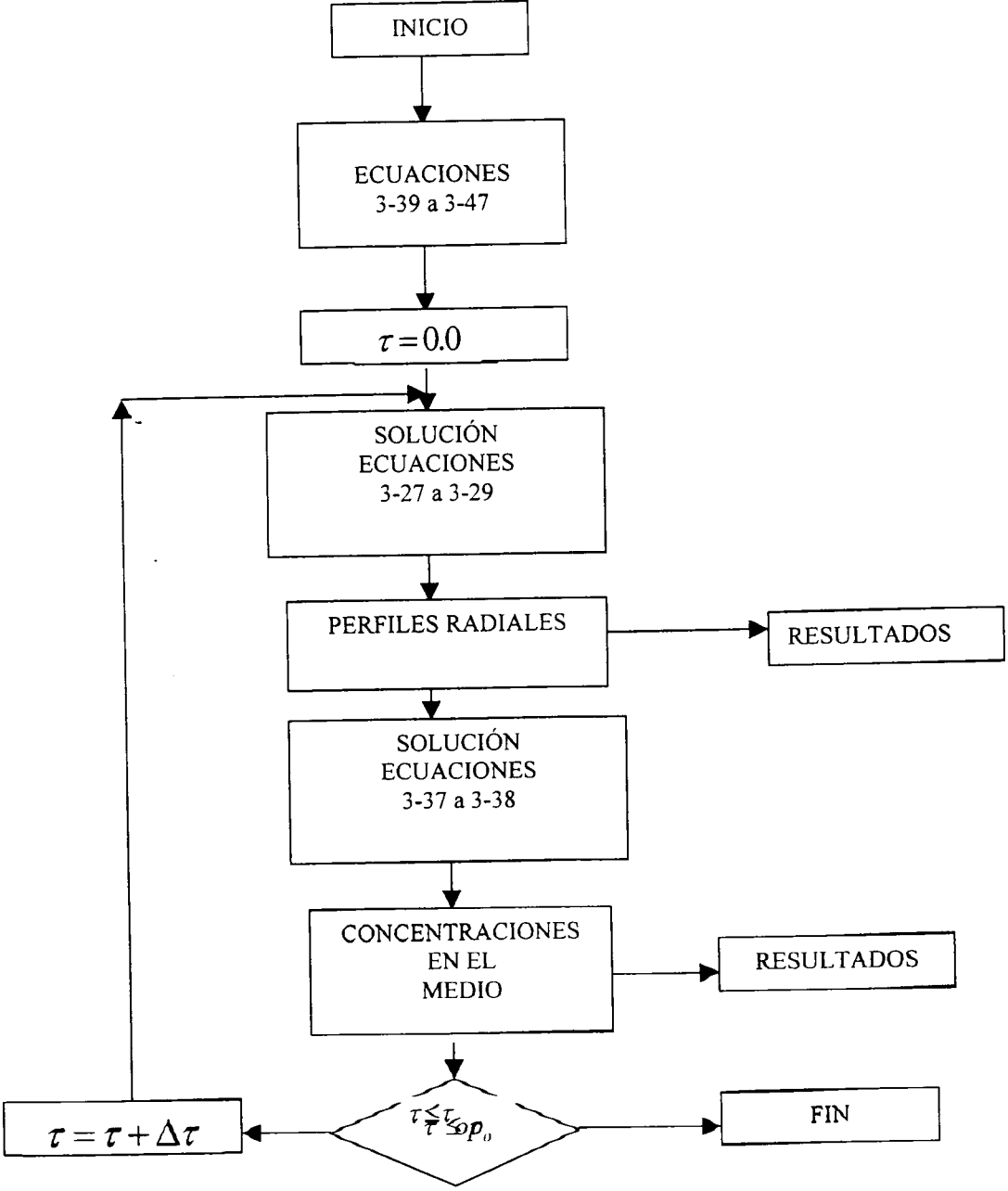


Figura 3.12 Algoritmo del programa CLCI3555.FOR para la solución del modelo de difusión y reacción descrito por las ecuaciones 3-22 a 3-47.

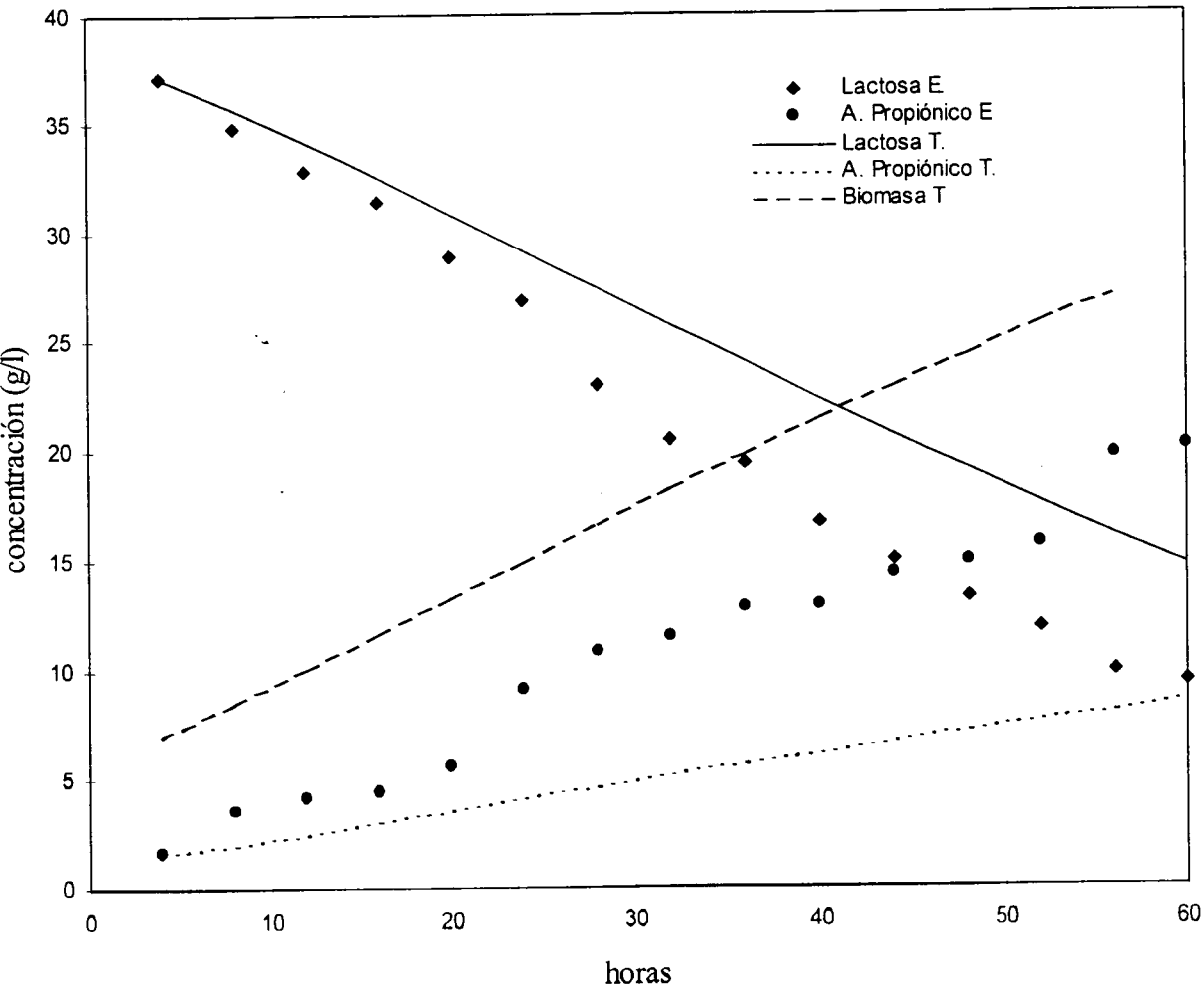


Figura 3.13. Cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizadas a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas.

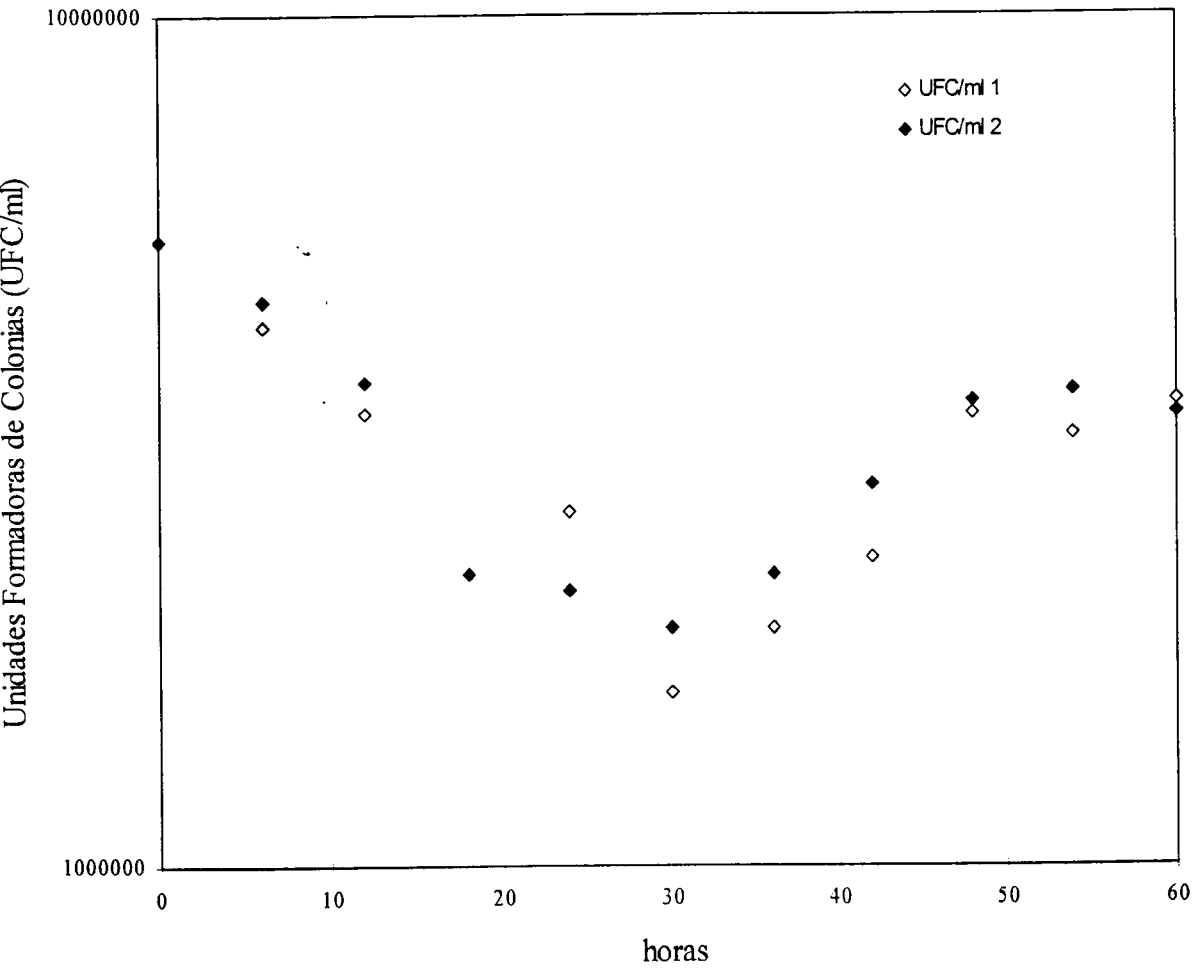


Figura 3.14. Crecimiento celular dentro de la esfera como unidades formadoras de colonias por mililitro de soporte (UFC)

Tabla 3.11 Parámetros estimados del modelo con crecimiento.

Parámetro	Valor
μ_{MAX}	0.1861
K_S	5.3425
K_P	32.0000
K_D	0.1090
m	1. E-06
$Y_{S/X}$	2.7725
$Y_{P/S}$	0.6034

La Figura 3.15 muestra los datos experimentales y las curvas calculadas considerando los valores de los parámetros de la Tabla 3.11. Como puede observarse el modelo ajusta bien los datos experimentales de consumo de lactosa y producción de ácido propiónico, la curva de crecimiento de biomasa parece una loma con pendientes suaves, por lo que se puede observar que de acuerdo al modelo la cantidad de biomasa no tiene una variación alta. Esto concuerda con los valores de los parámetros pues la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{MAX}) y la constante de mortandad K_d toman valores de la misma orden de magnitud. Esto físicamente puede interpretarse como que en el interior del soporte se presenta un equilibrio entre la mortandad y el crecimiento de nueva biomasa, de manera que no existe una variación significativa de ésta. Sin embargo, las velocidades de consumo y producción no están asociadas de forma importante a la cantidad presente de biomasa si no al crecimiento mismo.

3.2.3.2 MODELO SIN CRECIMIENTO CELULAR EN EL SOPORTE.

En esta sección se hace una simplificación del modelo anterior proponiendo como hipótesis principal que la cantidad inicial de biomasa permanece constante. En los modelos anteriores se consideró como reacción principal el crecimiento de biomasa mientras las velocidades de consumo y producción están ligadas a ésta. En este modelo se considera como reacción principal la velocidad de consumo de lactosa considerando como modelo cinético la ecuación de Michaelis Menten (Ecuación 3-48).

Ecuación de Michaelis Menten.

$$v_S = K\frac{SX}{K_m + S} \qquad 3\text{-}48$$

donde v_S es la velocidad de consumo de sustrato, K es la constante principal de la velocidad de reacción (tasa específica de consumo máxima) y K_m es la constante de Michaelis

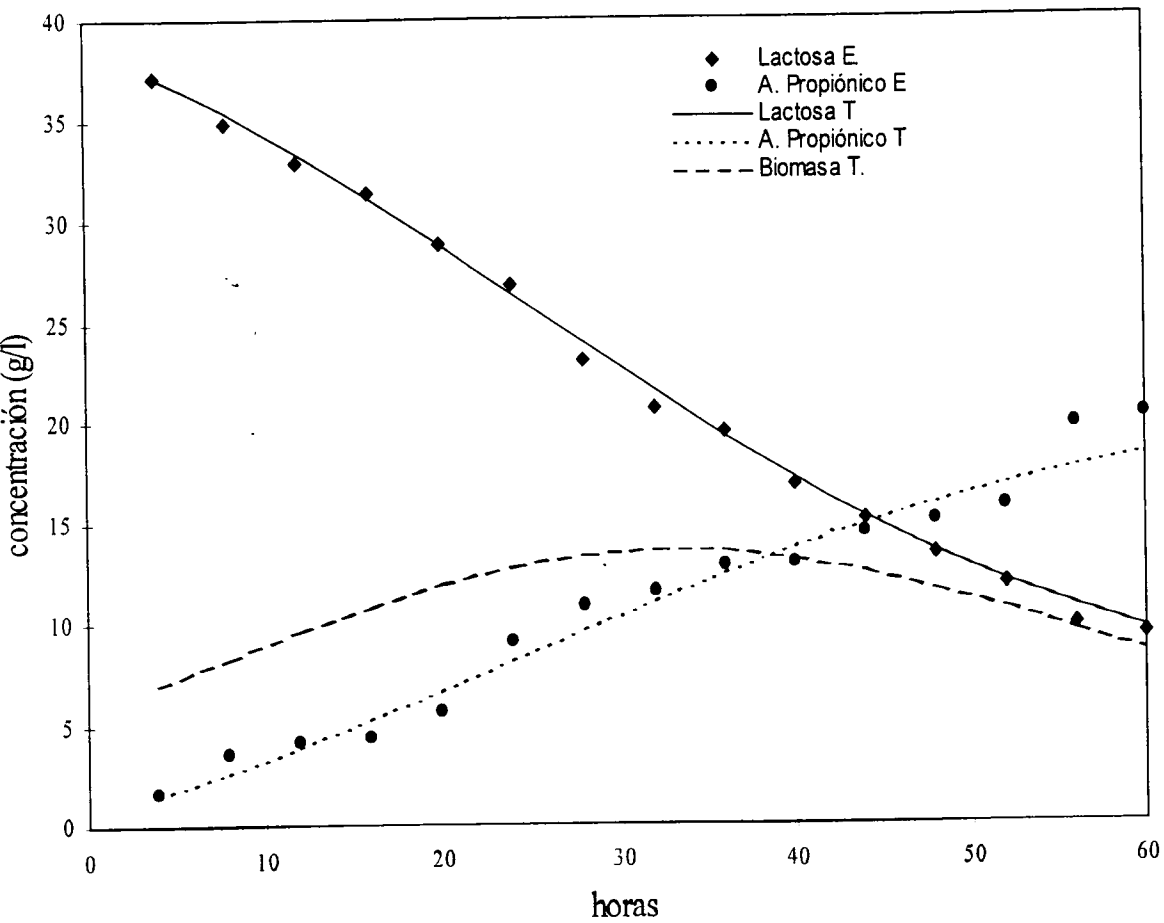


Figura 3.15 Cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizadas a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas de acuerdo a los parámetros de la Tabla 3-11 (Modelo con crecimiento).

Menten. Las ecuaciones para el sistema de difusión y reacción escritas en forma adimensional se presentan a continuación.

A) En la esfera de soporte:

Para la lactosa:

$$\frac{\partial S_{al}}{\partial \tau} = \left(\frac{\partial^2 S_{al}}{\partial R^2} + \frac{2}{R}\frac{\partial S_{al}}{\partial R} \right) - \phi \frac{S_{al} X_B}{K_m + S_0 S_{al}} \qquad 3\text{-}49$$

Para el ácido propiónico:

$$\frac{\partial P_{al}}{\partial \tau} = R_D \left(\frac{\partial^2 P_{al}}{\partial R^2} + \frac{2}{R}\frac{\partial P_{al}}{\partial R} \right) + \phi Y_{P/S} \frac{S_{al} X_B}{K_m + S_0 S_{al}} \qquad 3\text{-}50$$

B) En el caldo de fermentación:

Para la lactosa:

$$\frac{dS_{aL}}{d\tau} = -\frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \frac{\partial S_{aI}}{\partial \tau} dR - \frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \phi \frac{S_{al} X_B}{K_m + S_0 S_{al}} dR \qquad 3\text{-}51$$

Para el ácido propiónico:

$$\frac{dP_{aL}}{d\tau} = -\frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \frac{\partial P_{aI}}{\partial \tau} dR + \frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \phi Y_{P/S} \frac{S_{al} X_B}{K_m + S_0 S_{al}} dR \qquad 3\text{-}52$$

siendo ϕ el módulo de Thiele definido por la ecuación 3-53:

$$\phi = \frac{K R_0^2}{D_{ES}} \qquad 3\text{-}53$$

Estas ecuaciones fueron resueltas considerando las condiciones de frontera e iniciales de las ecuaciones 3-39 a 3-46 y sus parámetros estimados utilizando el programa REAINMOP.FOR (Apéndice D-4), los parámetros estimados para este modelo aparecen en

la Tabla 3.12 mientras en la Figura 3.16 se muestran los datos experimentales junto con los datos calculados (Apéndice E-3). El modelo presenta un buen ajuste a los datos experimentales, observándose un comportamiento más lineal de las curvas del modelo en consideración al observado en el modelo con crecimiento, que corresponde al valor bajo del parámetro K_m.

Tabla 3.12 Parámetros estimados del modelo sin crecimiento.

Parámetros	Valor
K	0.6165
K_m	7.7312
$Y_{P/S}$	0.6039
ϕ	0.5517

3.2.3.3 ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS MODELOS.

Las Figuras 3.17 y 3.18 muestran los residuales de los datos experimentales y las predicciones para los dos modelos desarrollados. En estas figuras se puede observar que existe poca dispersión de los residuales con respecto a la línea del cero y que la mayoría de ellos caen dentro del error experimental.

En la Tabla 3.13 se muestran las varianzas por falta de ajuste calculadas con los datos experimentales de Herrera (1997) y los datos calculados utilizando los dos modelos (Apéndice E-3).

Tabla 3.13 Análisis de varianza para los modelos con y sin crecimiento.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	$\frac{S_1^2}{S_2^2}$
Modelo I	40.08	22	1.8773	1.2428
Modelo II	45.28	27	1.6978	1.1283
Error experimental	39.07	26	1.5027	

La varianza experimental fue calculada con las series de datos de repetición para la lactosa y el ácido propiónico del Apéndice E-4. Los valores del parámetro estadístico, leídos de la tabla de distribución F, para los modelos con y sin crecimiento son: 1.975 y 1.925, respectivamente, que son superiores a los cocientes entre las varianzas de ajuste y la experimental en ambos modelos. Con esto se puede concluir que los dos modelos representan adecuadamente los datos experimentales reportados por Herrera (1997). Sin embargo el modelo sin crecimiento presenta la ventaja de tener tan sólo tres parámetros de ajuste. Por lo que este modelo sera seleccionado para los estudios posteriores mostrados en lo este trabajo.

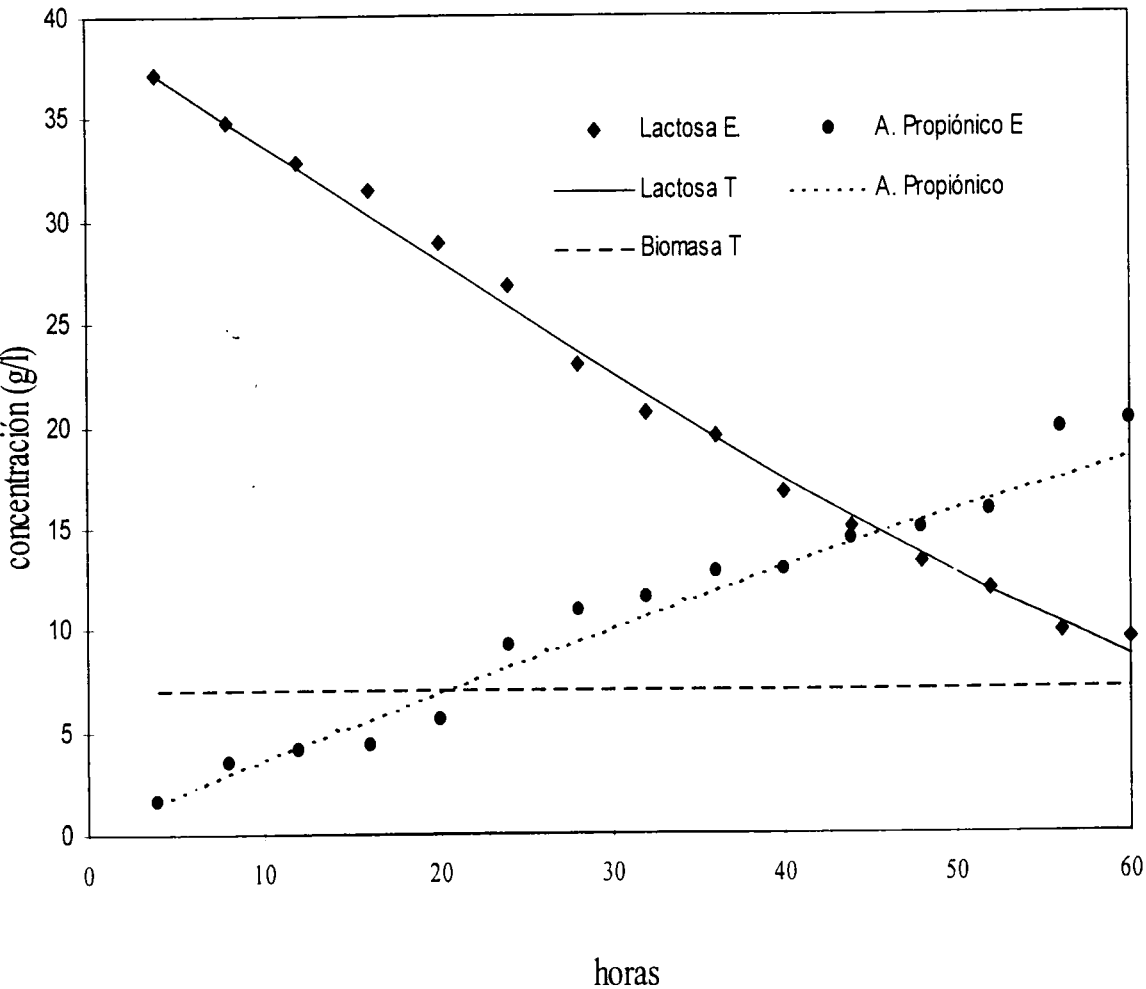


Figura 3.16. Cinética de la fermentación propiónica con células inmovilizadas a temperatura de 35°C, pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura. Datos experimentales y curvas calculadas utilizando el modelo sin crecimiento.

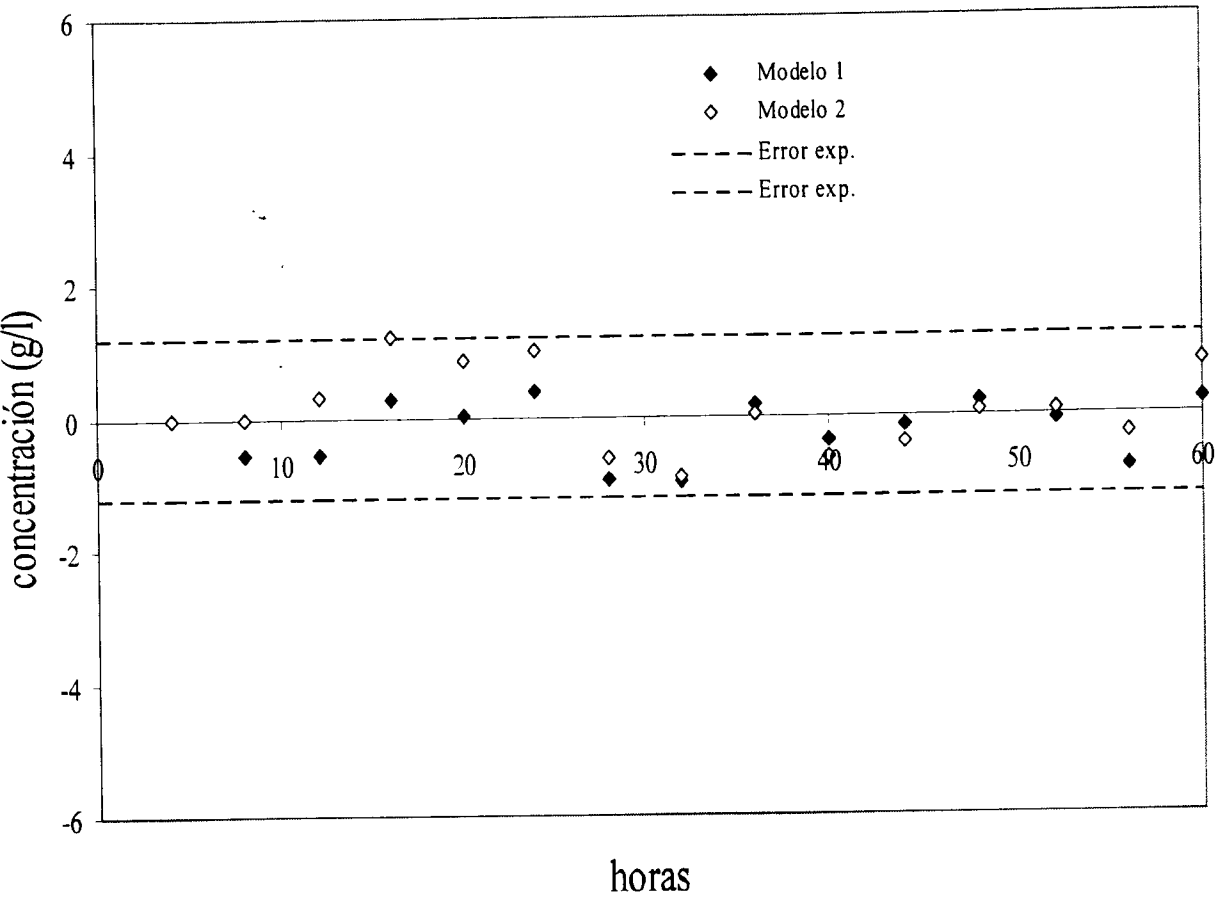


Figura 3.17. Gráfica de residuales en las predicciones para la lactosa de los modelos con y sin crecimiento, respecto a los datos experimentales reportados por Herrera (1997).

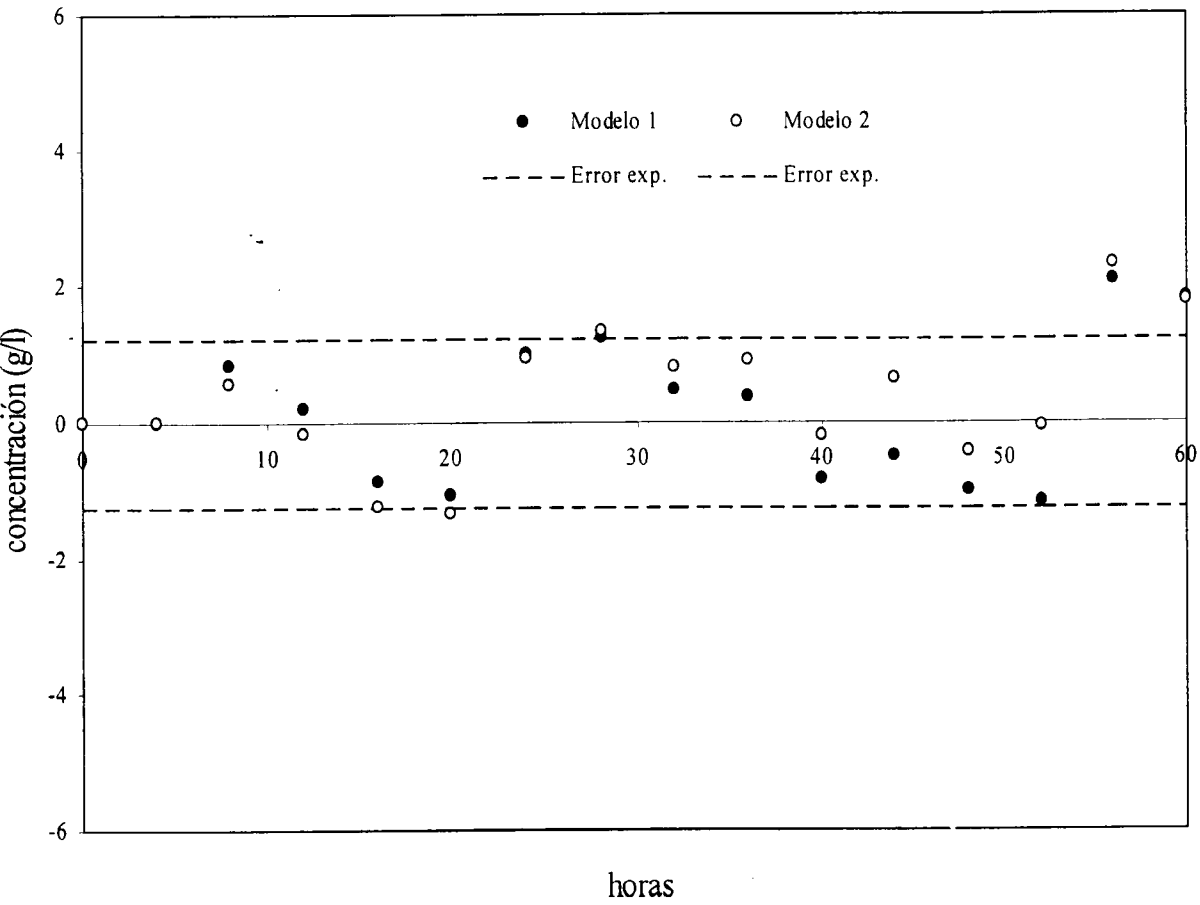


Figura 3.18. Gráfica de residuales en las predicciones para el ácido propiónico de los modelos con y sin crecimiento respecto a los datos experimentales reportados por Herrera (1997).

3.2.4 FACTOR DE EFECTIVIDAD.

En esta sección del capítulo se calculó el factor de efectividad definido por la ecuación 3-54 escrita en forma adimensional de acuerdo al modelo de difusión y reacción generado con el modelo sin crecimiento.

$$\eta = 3\frac{\frac{\partial S_{aI}}{\partial R}\sup}{\phi\frac{S_L X_{IB}}{K_m + S_0 S_L}} \qquad 3\text{-}54$$

El numerador de la ecuación anterior representa el flujo neto de la lactosa a través de la superficie de una esfera de soporte o la cantidad real de lactosa consumida por unidad de tiempo (velocidad observada) y el denominador es la cantidad de lactosa que se consumiría dentro de una esfera de soporte si la concentración en el interior de ésta fuera uniforme e igual a la existente en la superficie (velocidad sin limitaciones de transferencia de masa). Esta ecuación se resolvió numéricamente por diferencias finitas utilizando el programa TH.FOR (Apéndice D-5), en función de la variables discretizadas que son obtenidas de la solución numérica de la ecuación 3.49 evaluada en el estado estable.

Para el caso aquí estudiado se obtuvo el valor de 0.55 para el módulo de Thiele, y el factor de efectividad calculado es de 0.9798. Por consecuencia, se puede considerar que la transferencia de masa dentro de la esférula no tiene un efecto significativo sobre la velocidad de reacción global, siendo la etapa reactiva el factor dominante.

3.3 LECHO FLUIDIZADO Y OPERACIÓN EN CONTINUO.

Un problema importante en el uso de reactores con agitación mecánica es que la estabilidad estructural de la matriz del soporte no es grande lo que provoca desgaste en las esferas de soporte manifestado tanto por una disminución del tamaño como por adoptar una forma ovaloide. En esta sección se estudió como alternativa el uso de un reactor con lecho fluidizado donde la agitación se provoca por el burbujeo de una fase gaseosa inerte. Se espera que al igual que en el reactor tanque los efectos externos de transferencia de masa sean despreciables, y que las velocidades de consumo y producción puedan representarse por el modelo sin crecimiento.

3.3.1 DESCRIPCIÓN DEL REACTOR.

En la Figura 3.19 se muestra el reactor utilizado en estos experimentos, el cual está formado por dos tubos de vidrio concéntricos de 100 cm de largo con diámetros internos de 10 y 6.1 cm. En el interior del tubo interno se depositan el medio de cultivo y las esferas de soporte que por el burbujeo de nitrógeno se dispersaran en el medio. El espacio anular entre los dos tubos sirve para hacer recircular agua proveniente de la tina para mantener la temperatura deseada en el lecho.

En la parte inferior del reactor los tubos están soportados por una concha la cual cuenta con dos boquillas, una para la entrada del medio de cultivo fresco y la otra para la entrada del nitrógeno que se burbujea. El cabezal del reactor es removible para poder introducir y colocar el soporte del lecho a utilizar, cuenta además con salida para los gases de fermentación. En los costados del reactor están colocadas cuatro boquillas dispuestas en pares separados longitudinalmente por 30 cm. Estas boquillas pueden servir como puntos de muestreo, colocación de sensores, entrada para el agente neutralizante, salida de productos y otros usos. En el interior del reactor se colocó una varilla de acero inoxidable en la cual se montan platos perforados móviles que sirven para contener y confinar a un espacio determinado los lechos depositados.

En el equipo auxiliar al reactor se encuentra la tina de agua caliente con bomba de recirculación, las bombas peristálticas utilizadas para introducir el medio de cultivo y el agente neutralizante al reactor así como para retirar la corriente de producto por la parte superior. Para sensar y medir el pH y la temperatura se utiliza un potenciómetro con sus respectivos sensores, como tanques de alimentación se utilizaron los dos reactores tipo tanque anteriormente ya descritos, también se usaron algunos otros recipientes para recibir el caldo fermentado, contener el agente neutralizante, burbujear los gases de salida en solución alcohólica, además de otros accesorios como mangueras de silicón, jeringas, pinzas, abrazaderas, válvulas de paso, guantes de látex y gamuza, etc.

3.3.2 OPERACION DEL REACTOR.

El reactor inicialmente se lava con agua y detergente eliminando cualquier residuo sólido depositado en su superficie, posteriormente se llena completamente con una solución concentrada de hipoclorito de calcio y se deja en reposo durante 30 minutos para eliminar cualquier microbio presente. Se enjuaga vigorosamente con agua estéril varias veces para eliminar cualquier traza de hipoclorito, finalmente se llena completamente con alcohol etílico y se deja así durante la noche previa a la corrida. Las tuberías y demás accesorios utilizados en el montaje del reactor son esterilizadas en la autoclave. Antes de esterilizar se deben hacer todas las conexiones posibles para minimizar las manipulaciones posteriores a la esterilización. Todos los accesorios y el

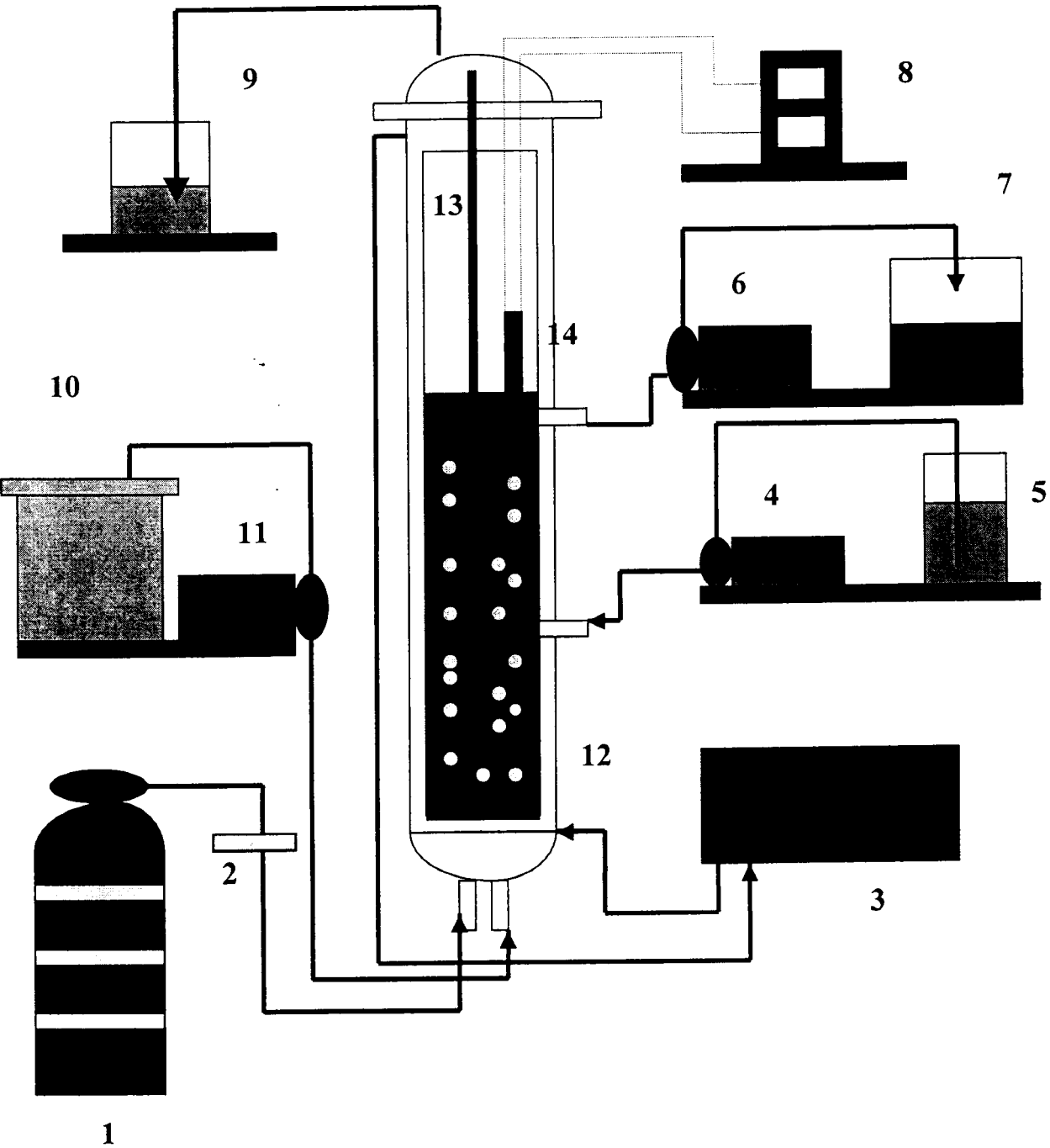


Figura 3.19 Reactor con lecho fluidizado. 1.-Tanque de N2, 2.- Filtro, 3.-Tina de agua caliente, 4.-Bomba de Neutralizante, 5.- Neutralizante, 6.- Bomba de Producto, 7.- Deposito de producto, 8.- Potenciometro pH y Temperatura, 9.- Recibidor de gases, 10.- Tanque de alimentación, 11.- Bomba de alimentación, 12.- Reactor, 13.-Varilla de soporte ,14.- Sensor de pH y Temperatura.

reactor vacío se dejan expuestos a la luz ultravioleta durante 30 minutos. Pasado este tiempo se realizan las conexiones de las mangueras al reactor dejando las otras puntas libres para conectarlas posteriormente al equipo auxiliar. Estas manipulaciones deben hacerse preferentemente bajo la campana de flujo laminar para minimizar riesgos de contaminación.

El reactor es colocado en su reja de sustentación mediante abrazaderas, entonces se hacen las conexiones hacia las bombas de alimentación, de producto y de agente neutralizante, así como la manguera hacia el tanque de nitrógeno y la solución alcohólica para recoger los gases de fermentación. En este momento ya se debe tener el caldo de alimentación esterilizado y frío así como la esférulas de soporte que van a formar el lecho.

Para cargar las esférulas al reactor, se retira el cabezal y la varilla de acero se levanta hasta que el último plato queda cerca de la boca superior del reactor, entonces las esférulas son vaciadas. Todas las manipulaciones deben realizarse bajo la flama alta de un mechero Fisher, en este momento también se llena el reactor con el caldo de cultivo hasta el nivel deseado y se coloca el sensor de temperatura y de pH. Una vez realizadas estas tareas el cabezal es nuevamente colocado y el reactor esta listo para empezar a trabajar.

Una vez tapado el reactor y asegurándose que todas las conexiones fueron realizadas de manera firme, se procede a abrir la válvula para permitir la entrada del nitrógeno cuyo flujo debe ser lo suficientemente fuerte para mantener el lecho fluidizado. En la manguera de nitrógeno se colocaron: un filtro con una membrana de 0.2 micras y una válvula de aguja a la salida del tanque para un mejor control del flujo así como para evitar desfogues y que el nitrógeno se escape por fallas en la válvula de diafragma del regulador, la presión de descarga se fijó en 100 psi.

Cuando se inicia la operación en continuo se arrancan las bombas de alimentación y de salida de producto, el control del flujo en el reactor se hace calibrando manualmente la bomba de salida de producto y manteniendo un nivel constante en el reactor regulando la velocidad de la bomba de alimentación. La toma de muestra se hace por la salida de la bomba de producto. El cambio del tanque de alimentación se debe hacer bajo la flama de mechero limpiando el área cuidadosamente con alcohol y fenol. De preferencia el cambio se hace cuando el tanque este aún caliente debido a que el mismo calor que despide puede servir como agente de esterilización y puesto que los flujos que se manejan son pequeños no se provocan cambios en la temperatura del reactor.

3.3.3 FERMENTACIÓN EN EL LECHO FLUIDIZADO.

Un objetivo de esta sección fue estudiar la posibilidad de que las velocidades de consumo de lactosa y de producción de ácido propiónico en el reactor con lecho fluidizado, en operación por lote y en continuo, puedan representarse con el modelo de reacción y difusión sin crecimiento para la fermentación con células inmovilizadas en el reactor de tanque agitado. La hipótesis se plantea, considerando que el comportamiento del sistema en el lecho fluidizado puede suponerse similar al del tanque agitado por la baja relación entre la altura y el diámetro del lecho (11 veces mayor) y por el mezclado producido por el burbujeo de nitrógeno.

Un segundo objetivo fue estudiar si el crecimiento celular nulo encontrado por Herrera (1997) en el interior de las esferas, durante la fermentación por lote, puede deberse a la baja cantidad de extracto de levadura usado en sus experimentos. Siendo éste un factor primordial en el crecimiento celular pudo ser insuficiente para aumentar significativamente la biomasa inmovilizada. Para este estudio el reactor fue operado en continuo a dos diferentes velocidades de dilución. La primera de ellas buscando un consumo bajo de nutrientes, por lo que se espera que en el reactor exista una oferta de extracto de levadura que sea suficiente para generar un crecimiento celular alto en el interior de las esferas. Posteriormente el flujo se redujo, para observar si las velocidades de consumo y de producción se incrementaran en virtud de un aumento en la cantidad de biomasa inmovilizada ó solo en una proporción debida a la disminución de la velocidad de dilución.

Un objetivo adicional fue estudiar si, al igual que como sucedió en la fermentación con células libres, existe una mejora significativa en la productividad al incrementar la temperatura del sistema. Se usa como valor de referencia la temperatura de mayor productividad del sistema con células libres.

El reactor fue cargado con 1850 ml de medio de cultivo fresco y 200 ml de esferas de soporte, relación de volúmenes que permite tener buenas condiciones de fluidización en el lecho. La carga inicial de biomasa en las esferas de soporte fue de siete gramos por litro. Se mantuvo un pH de 5.5. El caldo de fermentación se enriqueció con 2.5 g/l de extracto de levadura y la temperatura se fijó en 37°C. La concentración inicial de lactosa en el medio de cultivo de alimentación es aproximadamente 50 g/l. En este experimento el reactor fue operado inicialmente en operación por lote durante 36 horas, para posteriormente seguir con la operación en continuo. En el primer período de ésta el flujo de alimentación se fijó en 2 ml/min. El segundo período se redujo hasta 1 ml/min.

En la representación cinética se utilizan las ecuaciones 3-51 a 3-54, incluyendo una modificación a las ecuaciones 3-51 y 3-52 por los términos de entradas y salidas al reactor en la operación continua, quedando de la siguiente manera:

Para la lactosa:

$$\frac{dS_{aL}}{d\tau} = \frac{F_0 R_0^2}{D_{ES} V_L}(1 - S_{aL}) - \frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \frac{\partial S_{aI}}{\partial \tau} dR - \frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \phi \frac{S_{aI} X_B}{K_m + S_0 S_{aI}} dR \qquad 3\text{-}60$$

Para el ácido propiónico:

$$\frac{dP_{aL}}{d\tau} = -\frac{F_0 R_0^2}{D_{ES} V_L} P_{aL} - \frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \frac{\partial P_{aI}}{\partial \tau} dR + \frac{3V_I}{V_L}\int_0^1 R^2 \phi Y_{P/S} \frac{S_{aI} X_B}{K_m + S_0 S_{aI}} dR \qquad 3\text{-}61$$

donde la nueva variable que aparecen en estas ecuaciones es el flujo volumétrico de alimentación F_0 con unidades de m^3/h.

Es importante señalar que la estructura física de las esferas de soporte no mostró daños visibles después de una fermentación continua de 220 horas en el reactor con lecho fluidizado bajo las condiciones ya descritas.

Las ecuaciones del modelo fueron resueltas utilizando el programa FERSIM.FOR (Apéndice D-6). Los parámetros para estas nuevas condiciones de operación también fueron estimados con este programa, considerando los datos experimentales del Apéndice E-4. Los valores de los parámetros se muestran en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14 Parámetros cinéticos del modelo sin crecimiento para la fermentación en el lecho fluidizado.

Parámetro	Valor
φ	0.8479
K	0.9474
K_m	7.600
$Y_{P/S}$	0.3659

En la Figura 3.20 se muestran los datos experimentales junto con las curvas calculadas por el modelo donde se observa que existe un buen ajuste entre estos. En la Figura 3.21 se presentan los residuales de los datos experimentales respecto a los valores calculados por el modelo (Apéndice E-3). Del análisis de las figuras anteriores se observa que dispersión de los datos está por abajo del error experimental y también que no existe ninguna tendencia evidente en su distribución alrededor de la línea de cero.

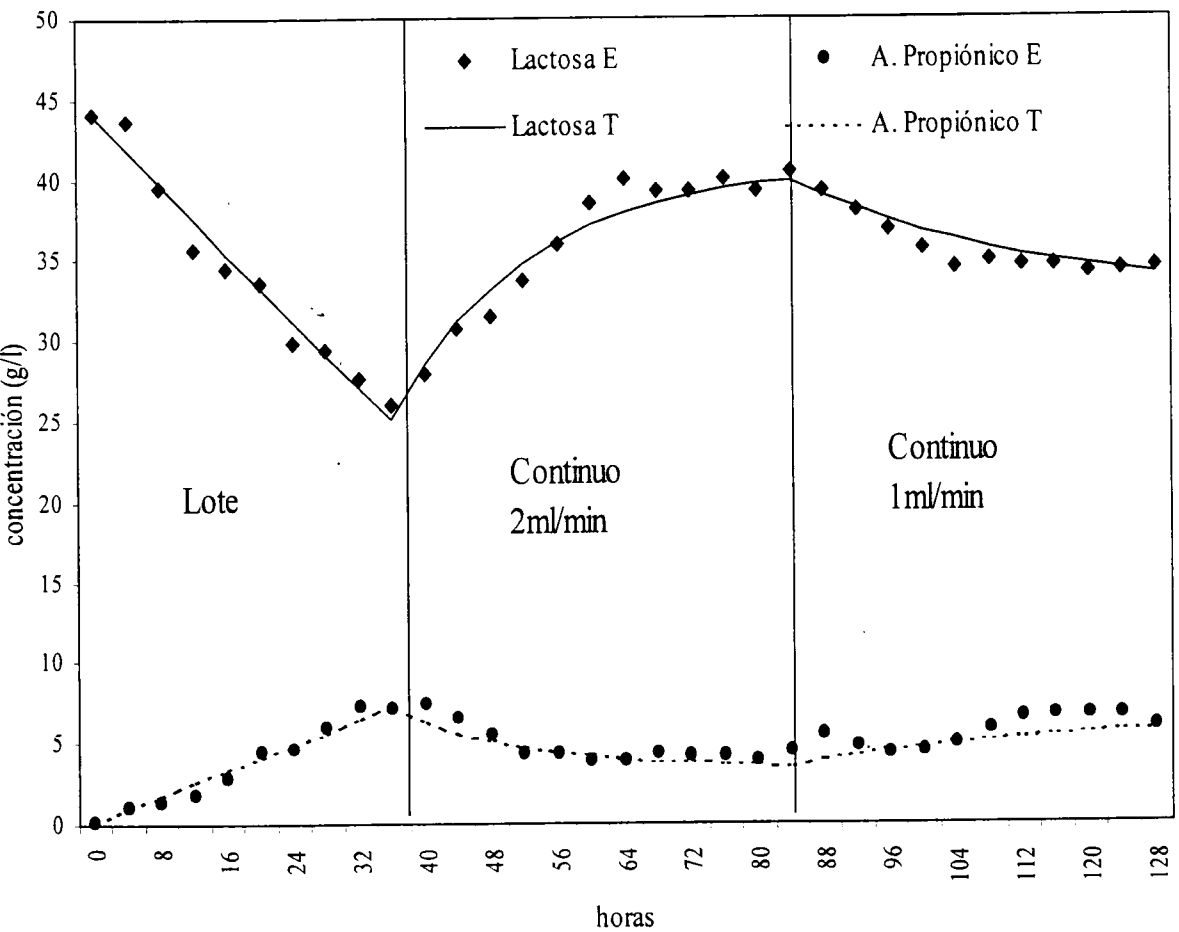


Figura 3.20 Datos experimentales y curvas calculadas de la fermentación propiónica en un lecho fluidizado a temperatura de 37°C, un pH de 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura.

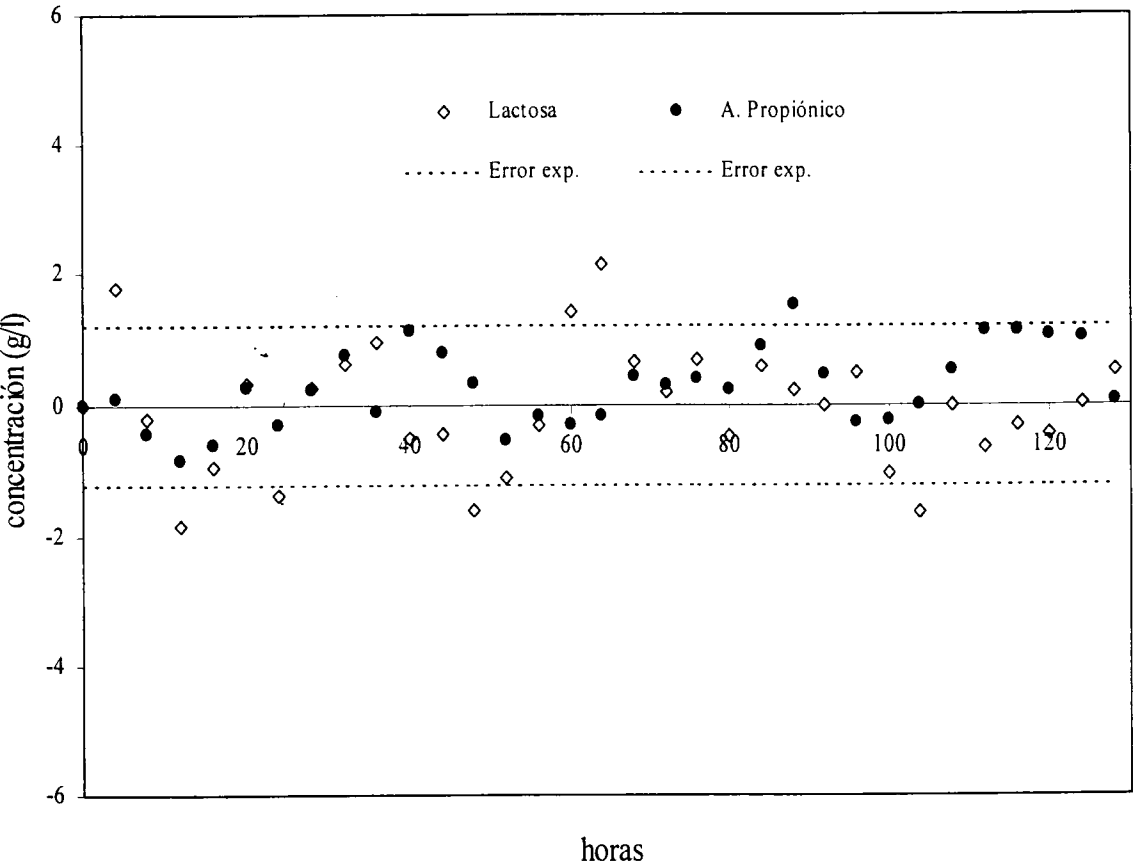


Figura 3.21 Gráfica de residuales para la lactosa y el ácido propiónico.

La prueba de falta de ajuste para este sistema se presenta en la Tabla 3.15, el valor del parámetro estadístico, leído de la tabla de distribución F, para los grados de libertad de la tabla es 1.80, el cual es superior al cociente entre la varianza por falta de ajuste y la varianza experimental, con esto se puede concluir que el modelo representa adecuadamente los datos experimentales de esta fermentación.

Tabla 3.15 Análisis de varianza para el modelo sin crecimiento en el lecho fluidizado.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	$\frac{S_1^2}{S_2^2}$
Falta de ajuste	85.54	59	1.4270	0.9496
Error experimental	39.07	26	1.5027	

La tasa específica máxima de consumo de lactosa dada por K en la ecuación de Michaelis Menten, es el parámetro que caracteriza la rapidez de consumo bajo ciertas condiciones de operación. De forma análoga el producto ($Y_{P/S} \cdot K$) representa la tasa específica máxima de producción del ácido propiónico. En la Tabla 3.16 se presenta una comparación de estos parámetros con los obtenidos en la fermentación a 35°C estudiada en la sección anterior. Como puede observarse la tasa específica máxima de consumo de lactosa se incrementa a 37°C, sin embargo la velocidad de producción de ácido propiónico caracterizada por su tasa específica máxima de producción disminuye. Con esto se puede concluir que bajo estas condiciones, incrementar la temperatura a 37°C no repercute en un aumento de la productividad del sistema.

Tabla 3.16 Comparación de parámetros cinéticos a temperaturas de 35 y 37°C.

Temperatura	K	Yp/s	$Y_{P/S}K$
35°C	0.6165	0.6038	0.3723
37°C	0.9474	0.3659	0.3467

Como se observó en la Figura 3.20, el modelo representa bien los datos experimentales, tanto en la operación por lote como en la continua con los dos flujos de alimentación. La suposición sobre la cantidad constante de biomasa inmovilizada parece ser adecuada, aun cuando el extracto de levadura como factor primordial en el crecimiento celular sea abundante. De esta manera los cambios observados en estos dos periodos de operación continua se deben únicamente a los diferentes flujos de alimentación utilizados.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1 CONCLUSIONES.

Del análisis de residuales obtenidos para el modelo cinético estudiado, en el sistema con células libres, en donde las velocidades de consumo y producción están directamente asociadas a la velocidad de crecimiento de biomasa, se observa una tendencia oscilatoria caracterizada por agrupaciones de puntos por arriba y por debajo de la línea del cero. Lo que permite concluir que existe una deficiencia en el modelo para poder representar las concavidades naturales que presentan los datos experimentales, principalmente en la fase de lactancia de la biomasa.

El modelo anterior presenta cierta mejora al incluir términos empíricos (llamados de retraso) que permiten atenuar el crecimiento inicial de las curvas de concentración calculadas. Esto puede ser resultado de la flexibilidad adquirida por el modelo debido a la independencia entre las ecuaciones proporcionada por los términos de retraso incluidos. Este modelo pasó la prueba estadística, sin embargo, aún presenta deficiencias de precisión respecto a los datos experimentales.

Los dos modelos presentan una mayor deficiencia en la predicción de los datos de la lactosa. Esto puede deberse a que para esta especie los valores experimentales obtenidos son aquellos que conllevan un mayor error experimental en su determinación.

Del estudio realizado de la fermentación con células libres respecto al efecto de las condiciones de operación sobre la productividad del sistema se obtienen como valores óptimos para la temperatura 36.58°C; para el pH 6.23; y para el extracto de levadura en el caldo de cultivo 5.60 g/l. Estos valores se obtuvieron por un análisis de superficie de respuesta, representada ésta por un polinomio cúbico obtenido del ajuste de los datos experimentales de tres diseños secuenciales.

El modelo de difusión y reacción con crecimiento para el sistema con células inmovilizadas fue capaz de reproducir los datos experimentales de la fermentación con células inmovilizadas. De acuerdo con los resultados, se puede deducir que en el interior del soporte se establece un equilibrio entre las velocidades de crecimiento y mortandad de biomasa, de manera que la cantidad de ésta no sufre cambios importantes. Por otro lado, se verifica que las velocidades de consumo y producción están principalmente asociados al crecimiento de biomasa ya que los términos no asociados o de mantenimiento resultaron despreciables.

El modelo de difusión y reacción sin crecimiento, es una simplificación del modelo anterior, en el cual la cantidad de biomasa inmovilizada se supone permanece constante. La velocidad de consumo de lactosa está representada por la ecuación de Michaelis Menten, mientras que la velocidad de producción de ácido propiónico está directamente asociada al consumo.

Ambos modelos estudiados de difusión y reacción, con y sin crecimiento de biomasa, presentan una buena predicción de los perfiles de concentración de las especies y una varianza de los datos ajustados menor que la varianza de los datos experimentales. Sin embargo, el modelo sin crecimiento ofrece una mayor simplificación del modelo y sólo cuenta con tres parámetros de ajuste, lo que lo hace más práctico.

La cinética observada en la fermentación con células libres es diferente a la cinética intrínseca del sistema con células inmovilizadas. Por otro lado, los cambios en las condiciones de operación tienen un efecto diferente sobre la productividad en los sistemas con células libres y con células inmovilizadas estudiadas en este trabajo. Esto puede evidenciar que las condiciones en los microambientes del soporte son diferentes a las prevalecientes en el medio global. De esto se puede establecer que los resultados de los estudios con células libres sólo deben considerarse como una referencia, que no puede extrapolarse de forma directa a los estudios con células inmovilizadas.

De acuerdo al factor de efectividad calculado se puede decir que la transferencia interna de masa en el proceso, no tiene un efecto significativo en la velocidad global observada siendo las reacciones microbiológicas las que constituyen la etapa controlante sobre los procesos de difusión.

El modelo de difusión y reacción sin crecimiento desarrollado para el reactor tipo tanque agitado es capaz de reproducir la cinética observada en el lecho fluidizado aún en periodos largos de operación. Indicando que las características hidrodinámicas en ambos reactores son similares. La suposición sobre que la cantidad de biomasa inmovilizada permanece constante en el soporte bajo las condiciones estudiadas es adecuada aún en periodos prolongados de operación, y al parecer no depende de una escasez del extracto de levadura. En el reactor de lecho fluidizado las esferas de soporte no mostraron deterioro físico.

4.2 RECOMENDACIONES.

Los modelos obtenidos en este trabajo sólo constituyen la herramienta inicial para explorar nuevas configuraciones de reactores más eficientes y de mayor capacidad, sin

embargo, para hacer escalamientos a niveles de planta piloto o industrial, hace falta conjuntar una serie de estudios de hidrodinámica, transferencia de calor y transferencia de masa que conlleven a obtener reglas de escalamiento confiables. Este es un trabajo que ofrece expectativas del ingeniero químico en el área de los procesos biotecnológicos.

Hacer un estudio para determinar las condiciones de operación más favorables en el sistema inmovilizado. Los factores que pueden considerarse son: La temperatura, el pH y la cantidad de extracto de levadura en niveles y combinaciones aún no estudiadas; relación volumen de esferas de soporte y volumen de medio de cultivo y grados de mezclado.

Revisar e implementar técnicas experimentales que permitan estudiar al microorganismo inmovilizado y sus microambientes, para hacer modelos cada vez más mecanísticos.

Realizar un estudio de la estabilidad de las esferas con células inmovilizadas en operación continua durante tiempos prolongados de operación para determinar su vida útil. Este estudio es indispensable para pensar en la factibilidad de una aplicación a nivel comercial.

Para incrementar la productividad del proceso se estudió alternativamente la fermentación con células inmovilizadas en un reactor tubular de lecho fijo. Se usó una corriente de recirculación para homogeneizar el lecho y tener un control adecuado del pH. Las velocidades de reacción observadas fueron significativamente superiores a las del lecho fluidizado y al reactor tipo tanque estudiado. Sin embargo, se presentaron problemas operacionales como: compactación de las esferas de soporte sobre el plato superior de confinación del lecho, acumulación de CO_2 y formación de conglomerados provocando altas caídas de presión en el lecho. Se propone sustituir el lecho fijo por un lecho con una relación óptima entre el volumen de esferas de soporte y el volumen de medio de cultivo (fracción de huecos baja), de tal manera que en el lecho se permita la movilidad de las esferas de soporte y se eliminen las zonas de compactación y la acumulación de CO_2. También se recomienda el uso bombas de acero inoxidable que sean esterilizables y minimicen el posible riesgo de contaminación.

En el estudio de la fermentación en el tanque agitado y el lecho fluidizado, un factor no considerado fue el cociente del volumen del soporte y el volumen de medio, al parecer al aumentar este cociente, la productividad debiera favorecerse en virtud del incremento de la densidad celular en el sistema. En contraposición también los efectos de resistencia a la transferencia interfacial de masa entre el medio y el soporte se harían más significativos. Un trabajo importante por hacer sería caracterizar este efecto en función de coeficientes globales de transferencia externa de masa.

Otro aspecto por estudiar es la distribución de las esferas de soporte a lo largo de la columna de fluidización, tal distribución depende de factores como las propiedades reológicas del medio, la densidad y el tamaño de las esferas, la fracción de huecos, la velocidad de flujo a través del lecho o el flujo de la fase dispersante y otros. La construcción de un modelo hidrodinámico que representara esta distribución sería importante para evaluar las velocidades globales de reacción a través de todo el reactor.

BLIBLIOGRAFÍA

- Alais, C., *Ciencia de la Leche,* Editorial CECSA, s/n de edición, México, (1994).
- Amiot, J., *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Editorial Acribia, Novena reimpresión, España, (1991).
- Bailey, J. E. y Ollis, D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, Segunda edición, McGraw – Hill International Editions, USA, (1986).
- Blanc, P y Goma, G., *Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation*, Bioprocess Engineering 2 :175-179, (1987a).
- Blanc, P y Goma, G., *Propionic acid fermentation improvement of performance by coupling continuos fermentation and ultrafiltration*, Bioprocess Engineering, Vol. 2, pp. 137-139, (1987b).
- Boyaval, P. y Corre, C., *Continuos Fermentation of Sweet Whey Permeate For Propionic Acid Production in a CSTR With of Recycle*, Biotechnology Letters, Vol. 9 No. 11, pp. 801-806, (1987).
- Brodelius, P. y Vandame, E.J., *Immobilized Cell Systems*, Biotechnology, VCH, Federal Republic of Germany, Capítulo 8, Vol. 7.A, (1987).
- Butler, M. y Dawson, M., *Cell Culture Lab Fax*, Editorial Bios Scientific Publishers Academic Press, s/n de edición, Inglaterra, (1987).
- Carrondo, M.J.T., Crespo, J.P.S.G. y Mour,a M. J. Proc. 4th Eur. Congress Biotechnol., Vol 1, pp 97-100, (1987).
- Cavin, J. F., Saint, C. y Divies, C., Biotech. Lett.,Vol. 7, pp 821-826, (1985).
- Clausen, E.C. y Gaddy, J.L., Chem. Eng. Prog., Vol. 80, pp 59-63, (1984).
- Constantinides, A., Applied Numerical Methods Whith Personal Computers, Editorial Mc Graw Hill International Editions, s/n de edición, Singapur, (1987).
- Davidson, J.F. y Harrinson, D., *Fluidization*, Editorial Academic Press Inc, Segunda edición, Inglaterra (1977).
- Gencer, M.A. y Mutharsan., *Ethanol Fermentation in a Yeast Inmobilized Tubular Fermentor*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXV, pp. 2243-2262, (1983)

- Godia, F., Casas, C. y Sola C. *Mathematical Modelization of Packed Bed Reactor Performance With Immobilized Yeast for Ethanol Production*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 30, pp. 836-843, (1987).

- Herrera, E. F., *Obtención del Biocatalizador y las Condiciones de Operación Optimas para la Fermentación Propiónica con Propionibacterium*, Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Celaya, (1997).

- Hossain, M. M. y Do, D.D. *General Theory of Determining Intraparticle Actived Immovilized Enzyma Distribution and Rate Parameters*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33, pp. 963-975, (1989).

- Karel, S. F. y Robertson, C. R. *Autoradiographic Determination of Mass Transfer Limitations in Immobilized Cell Reactor*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 34, pp. 320-336, (1989).

- Lee, Y. Y. , Fratzke, A.R., Wun, K. y Tsao, T., Glucose Isomerase Immovilized on Porous Glass, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XVIII, pp. 389-413, (1976).

- Luquet, F.M., *Leche y Productos Lacteos*, Editorial Acribia, España, (1991).

- Lüong, J.H.T. *Cell Immobilization in K-Carrageenan for Ethanol Production.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVII, pp. 1652-1661, (1985).

- Magaña, I. P., *Ensayos Preliminares con Propionibacterium inmovilizado para obtener ácido propiónico utilizando diferentes carbohidratos*, Reporte Interno, CINVESTAV-IPN, 1995.

- Matsunaga, T., Karub, I. y Susuky, S. *Some Observations on Hidrogen Producing Bacteria: Behavier of Hydrogen in Gel Membranes*, Biotechnology and Bioengineering, Vol XXII, pp. 2607-2615, (1980).

- Mc Gilvery, R. W., Conceptos bioquímicos, Editorial Reverte, España, (1977).

- Melick, M.R., Karim, M.N., Linden, J.C., Dale, B. T. y Mihaltz, P., *Mathematical Modeling of Ethanol Production by Immobilized Zymomonas mobilis in Packed Bed Fermenter, Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIX, pp. 370-382, (1987).

- Montes, M.C. y Magaña, I. P., *Δ-Dehydrogenation of steroids by arthrobacter simplex inmobilized in calcium polygalacturonate beads*, Journal of Industrial Microbiology, Vol. 8, pp.259-264, (1991).

- Montgomery, D.C., *Diseño y Análisis de Experimentos*, Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C. V., Traducción al español de la primera edición, México, (1991)

- Moynihan, H.J., Lee, C. K., Clark, W. y Wang, H. L., *Urea Hidrolysis by Immobilized Urease in Fixed Bed Reactor: Analysis and Kinetic Parameter Estimation.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 34, pp. 951-963, (1989).

- Nakasaki, K., Murai, T. y Akiyama, T.. *Dynamic Modeling of Immovilized Cell Reactor Application to Ethanol Fermentation*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33, pp. 1317-1323, (1989).

- Obaya, M. T., Ramos, J., Eng, F., Villa, P. y Valdés, E., *Síntesis de ácido propiónico por vía microbiológica I. Efecto de la concentración inicial de sustratos y productos*, Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azucar, Vol XXVI-No 1, pp.1-9, (1992).

- Ollis, D. F.y Sayles, G. D., *Modeling of Immobilized Microbial Cells: Influence of Substrate or Product Inhibition on Activity and Biomass Spatial Profiles*, American Chemical Society, (1992)

- Pérez, V. F., *Estudio Cinético de la Fermentación Propiónica en Lactosuero con Células Libres de Propionibacterium acidipropionici en un Bioreactor Batch*, Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Celaya, (1997).

- Perry, R.H., *Perry El Manual del Ingeniero Químico*, Mc Graw-Hill, México, (1992).

- Playne, M.J., *Propionic and butyric acids*, Comprehesive Biotechnology, Pergamon Press, Oxford, Vol. 3, pp. 731-758, (1985).

- Quesada-Chanto, A.,Afschar, A. S. y Wagner, F., *Optimization of Propionibacterium acidipropionici continuos culture utilizing sucrose*, Appl. Microbiol Biotechnol, Vol. 42, pp. 16-21, (1994).

- Quintero, R. R., *Ingeniería Bioquímica,*Editorial Alhambra, México, (1981).

- Schugerl, K., *Bioreaction Engineering Vol. I*, Editorial John Wiley & Sons, s/n de edición, Zuiza, (1987).

- Scriban, R., *Biotecnología*, Editorial El Manual Moderno, México, (1985).

- Silbinger, E., y Freeman, A., *Continuos Cell Immobilization in Cross Linked Polyacrylsmida Hydrazida Beads*, Biotechnology and Bioengineering,Vol. 30, pp. 675-680, (1987).

- Sherman, J.M. y Shaw, R.H., J. Biol. Chem., Vol. 56, pp 695-700, (1923).

- Smith, J. M., *Chemical Engineering Kinetics*, Editorial Mc Graw Hill, Tercera edición, USA, (1981).

- Stewart, W., Caracotsios, M. and Sorensen, J., *GREG*, Department of Chemical Engineering, University of Wisconsin Madison, USA, (1990).

- Tanaka, H., Masatoshi, M. y Yaliky, I. *Diffusion Characteristic of Substrate in Ca-Alginate Gel Beads*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVII, pp. 053-058, (1989)

- Tse, P. H.S., Leypold,t .J. K. y Gough, A. D. *Determination of the Intrinsic Kinetic Constants of Immobilized Glucosa Oxidasa and Catalasa*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIX, pp. 696-704, (1987).

- Veisseyre, R., *Lactología Técnica*, Editorial Acribia, Primera reimpresión, España, 1988.

- Vivian, P. L. y Shang, T. Y., *Propionic acid fermentation by propionibacterium acidipropionici: effect of growth substrate*. Appl. Microbiol Biotechnol Vol. 37, pp. 437-442, (1992a).

- Vivian, P. L. y Shang, T. Y., *Continuos Propionic Acid Fermentation by Immobilized Propionibacterium acidipropionici in a Novel Packed-Bed Bioreactor*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 40 No. 4, pp.465-474, (1992b).

- Woskow, S. A. y Glatz, B.A., *Propionic Acid Production by Propionic Acid Tolerant Strain of Propionibacterium acidipropionici in Batch and Semicontinuos, Fermentation*, Applied and Environmental Microbiology, pp 2821-2828, (1991).

APÉNDICE A
TAREAS PREVIAS A LA FERMENTACIÓN.

Apéndice A-1
PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CONSERVACIÓN (MEDIO 21)

OBJETIVO:

Formular un medio de cultivo adecuado para la conservación de la cepa del microorganismo (*Propionibacterium acidipropionici* CDBB1048) como liofilizado durante periodos prolongados de tiempo (Técnica proporcionada por CINVESTAV México, D.F.).

MATERIAL Y EQUIPO:

- Tubos con tapón de baquelita de 10ml.
- Pipetas graduadas de 5 y 10ml.
- Potenciómetro.
- Matraz Erlenmeyer de 500ml.
- Plancha magnética.
- Agitador magnético.
- Gasa/Magitel.
- Pipetas volumétricas de 5ml.
- Embudo de vidrio.
- Autoclave.
- Incubadora.
- Balanza Analítica.
- Campana de flujo laminar.

INGREDIENTES:

- Leche descremada en polvo (Difco/Badén) 100gr/lt.
- Jugo de tomate (de preferencia marca del Fuerte) 100gr/lt.
- Extracto de Levadura 5gr/lt.
- Agua destilada.
- Hidróxido de amonio concentrado.

PROCEDIMIENTO:

1. Filtrar el puré de tomate a través de un trozo de tela magitel, repitiendo la operación tres o cuatro veces, con el objeto de eliminar los sólidos.

2. Guardar el jugo (filtrado) en refrigeración por lo menos 24 horas antes de usarlo.

3. Esterilizar los tubos con tapón de baquelita y la cantidad requerida de agua destilada en un Matraz Erlenmeyer a 15psia durante 20 minutos.

4. Ajustar el pH del jugo de tomate a un valor de 7.0 con hidróxido de amonio concentrado.

5. Pesar las cantidades referidas de los ingredientes.

6. Mezclar y dosificar en cada tubo 5 ml de medio en condiciones asépticas.

7. Esterilizar los tubos con medio 21 a 15psia por 15 minutos.

8. Realizar prueba de esterilidad a los tubos llenos, dejándolos en incubación a 37°C por 48 horas. Pasado este tiempo, deberá ser desechado el contenido de aquellos tubos en donde se aprecie la formación de coágulos, lo que es indicio de contaminación.

NOTA: Para preparar 20 tubos se requieren 100ml de medio.

Apéndice A-2
PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

OBJETIVO:

Preparar el caldo de cultivo o de fermentación para la realización de las diferentes experimentos. El caldo es una solución acuosa de lactosuero en polvo desproteínizado y enriquecido con otros nutrientes (CINVESTAV – México D.F.).

MATERIAL Y EQUIPO:

- Matraz Erlenmeyer de 4 litros.
- Pipetas de 10 ml.
- Probeta de 1 l.
- Agitador magnético.
- Plancha magnética.
- Autoclave.
- Magitel.
- Algodón.
- Embudo de vidrio.
- Balanza analítica.
- Potenciómetro.

REACTIVOS:

- Ácido clorhídrico concentrado.
- Hidróxido de amonio concentrado.
- Citrato de sodio.
- Fosfato de amonio (NH4)2HPO4.
- Sulfato de magnesio Mg(SO4)·7H2O.
- Sulfato de manganeso Mn(SO4)·H2O.
- Extracto de levadura.

PROCEDIMIENTO:

1. Pesar 67 gramos de lactosuero en polvo, colocarlo en un matraz y agregar un litro de agua destilada.

2. Agitar hasta disolver. Esta operación puede hacerse con agitación magnética.

3. Colocar el electrodo para medir el pH, continuar agitando el suero y agregar ácido clorhídrico lentamente hasta bajar el pH de la solución hasta 4.

4. Precipitar las proteínas del lactosuero, por calentamiento en el autoclave por 20 minutos a 121 °C .

5. Dejar enfriar el suero para después filtrarlo con la ayuda de un embudo cubierto de una magitel y algodón, para separar las proteínas precipitadas.

6. Subir el pH hasta 7.0 agregando hidróxido de amonio concentrado.

7. Medir la cantidad de suero desproteínizado obtenido.

8. Pesar la cantidad necesaria de las sales para el suero y agregarlas al mismo en la siguiente relación.

Citrato de sodio	2g/l.
Fosfato de amonio	2g/l.
Sulfato de magnesio	0.1g/l.
Sulfato de manganeso	0.02g/l.
Extracto de levadura*	

*La cantidad de extracto de levadura depende de cada corrida en especial pues es una variable de estudio.

Apéndice A-3
RESEMBRADO DE LA CEPA.

OBJETIVO:

Este procedimiento se realiza para renovar la cepa (Cepa Madre) cuando llega el tiempo de su expiración y así contar con una nueva cepa de trabajo (Cepa Hija).

MATERIAL Y EQUIPO:

- Campana de flujo laminar.
- Frascos de dilución con tapón de baquelita.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Probeta graduada.

INGREDIENTES:

- Medio de cultivo.
- Suspensión de *Propionibacterium acidipropionici* congelada en medio de conservación.
- Tubos con medio de conservación sin inocular.

PROCEDIMIENTO:

1. Descongelar a temperatura ambiente medio de conservación que contenga *Propionibacterium acidipropionici* e inocular un frasco con medio de cultivo (aproximadamente 100 ml de medio de cultivo con 1.0 ml de medio conservación con *Propionibacterium acidipropionici*).

2. Incubar a 33 °C por 24 horas.

3. Inocular los tubos que contengan medio de conservación con 0.1-0.2 ml del medio de cultivo con 24 horas de incubación.

4. Colocar los tubos en la incubadora por entre 12 y 18 horas a una temperatura de 33° C (para determinar el final del tiempo de incubación, a partir de la hora 12 checar en cada tubo la formación de coágulos, evitar que se produzca una cantidad significativa de suero).

5. Refrigerar entre 7-8 °C por 1 hora.

6. Conservar en congelación (-10 a -20 °C). Cada ampolleta debe ser etiquetada con los siguientes datos: nombre del microorganismo, fecha de preparación y fecha probable de expiración. Los cultivos de conservación preparados siguiendo el procedimiento anterior, tienen una duración de 2 a 3 meses.

Apéndice A-4
PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

OBJECTIVO:

El inóculo es un cultivo de biomasa previo a la fermentación en el bioreactor. El inóculo permite una mejor adaptación del microorganismo al medio de fermentación disminuyendo significativamente la fase de arranque en su crecimiento.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Campana de flujo laminar.
- Frascos de dilución con tapón de baquelita.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Probeta graduada.
- Autoclave.
- Incubadora.

INGREDIENTES:

- Medio de cultivo.
- Suspensión de *Propionibacterium acidipropionici* congelada en medio de conservación.

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar la cantidad de medio de cultivo necesaria y agregar 6 g/l de extracto de levadura.
2. Disponerla adecuadamente en frascos de dilución y esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
3. Enfriar al chorro de agua.
4. Descongelar, a temperatura ambiente, medio de conservación con *Propionibacterium acidipropionici* .
5. En condiciones asépticas, inocular cada 100 ml de medio con 1 ml de la suspensión celular conservada en medio de conservación.
6. Incubarse durante 36 horas a 33 °C.

Apéndice A-5
INMOVILIZACIÓN CELULAR.

OBJETIVO:

Preparar el soporte con células inmovilizadas para las diferentes corridas. La técnica de inmovilización utilizada es el atrapamiento *in situ* en esférulas de poligalacturonato de calcio. En esta técnica una solución de ácido poligalacturónico y biomasa se gotea a una solución de cloruro de calcio, en la cual sucede la polimerización del ácido poligalacturónico. Sus ramificaciones quedan unidas a través de sus grupos de ácidos carboxílicos externos que reaccionan con el átomo bivalente de calcio formando una red compleja donde quedan atrapadas las células.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Probetas graduadas.
- Varillas de vidrio.
- Matraz Erlen Meyer.
- Barras magnéticas de media pulgada.
- Aguja hipodérmica de 0.3 mm de diámetro.
- Mangueras de silicón de 0.3 mm de diámetro.
- Tubos de ensaye de silicón para centrifuga.
- Estuche metálico con pipetas estériles.
- Gradilla.
- Estufa.
- Autoclave.
- Centrífuga.
- Potenciómetro.
- Bomba peristáltica.
- Plancha magnética.
- Campana de flujo laminar.

INGREDIENTES:

- Medio de trabajo.
- Inóculo con 60 horas de crecimiento.
- Hidróxido de amonio.
- Ácido poligalacturónico.
- Cloruro de calcio.
- Etanol.
- Tetraborato de sodio.

PROCEDIMIENTO.

Preparación de la solución de ácido poligalacturónico.

1. Preparar una solución acuosa de ácido poligalacturónico con una concentración de 80 g/l. Se debe alcanzar un pH de 8.0 para su completa disolución. La cantidad de solución debe ser la mitad del volumen total de esférulas requerido.
2. La solución debe prepararse con agua y todo el material estéril, bajo la campana de flujo laminar ya que esta solución no debe esterilizarce.

Preparación de la solución receptora de cloruro de calcio.

1. Preparar un litro de una solución acuosa de etanol al 4 % v/v.
2. Agregar a la solución cloruro de calcio y tetraborato de sodio para tener concentraciones 0.2M y 0.01M respectivamente.
3. Disolver los solutos y esterilizar la solución final en la autoclave.

Cosecha del microorganismo e inmovilización.

Todo este procedimiento debe llevarse a cabo bajo la campana de flujo laminar, tomando todas las medidas pertinentes para evitar cualquier fuente de contaminación.

1. Medir la biomasa en el inóculo preparado después de 60 horas de crecimiento. Determinar la cantidad necesaria de medio para obtener la concentración celular deseada en las esférulas de soporte.
2. Vaciar el volumen de medio del inóculo necesario en tubos de silicón de 12 ml previamente esterilizados y centrifugar a 5000 rpm. por 12 minutos.
3. Tirar el sobrenadante y con ayuda de un agitador de vidrio estéril redisolver el precipitado del tubo en caldo de cultivo (1/2 del volumen total de solución a inmovilizar) y vaciarlo a un matraz Erlen Meyer estéril.
4. Mezclar la solución de células con igual cantidad de solución de ácido poligalacturónico al 8 % p/v, para obtener una concentración final de 4% p/v de ácido poligalacturónico en las esférulas.
5. Poner la bomba en la campana y colocarle la manguera, en un extremo de la manguera deberá colocarse la aguja hipodérmica.
6. Poner a agitar en el nivel 3 de la plancha magnética la solución de cloruro de calcio estéril. Bombear la mezcla de células y ácido para gotearlas sobre la solución de cloruro de calcio. Cuidar que el bombeo no sea muy rápido que haga que las gotas de solución se adhieran unas a otras.
7. Tapar el matraz que contiene las esférulas y dejar reposar durante 12 horas en refrigeración.

8. Decantar la solución de cloruro de calcio y lavar tres veces con agua destilada estéril.
9. Suspender las esférulas en caldo y guardarlas en refrigeración hasta su uso.

APÉNDICE B
TAREAS DURANTE LA FERMENTACIÓN.

Apéndice B-1
MONTAJE Y ARRANQUE DEL BIOREACTOR (REACTOR TIPO TANQUE)

OBJETIVO:

Mostrar el procedimiento para arrancar una fermentación en el reactor tipo tanque agitado.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Fermentador de acero inoxidable de 2.2 lts.
- Agitador magnético.
- Tina de agua caliente con bomba de recirculación.
- Termómetro.
- Potenciómetro.
- Tubería de silicón.
- Mecheros Fisher.

INGREDIENTES:

- Medio de cultivo.
- Inóculo con 36 horas de crecimiento
- Hidróxido de Amonio concentrado.
- Alcohol al 96%.
- Ácido clorhídrico.
- Nitrógeno (gas).

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar el caldo de fermentación con la formulación deseada.
2. Agregar el medio de trabajo al biorreactor y equiparlo con todos sus aditamentos (Figura 3.1) a excepción de los sensores de temperatura y pH.

3. Tapar el reactor ajustando los 4 tornillos de la tapa en forma uniforme y esterilizar a 121 °C por 20 minutos

4. Conectar al reactor las mangueras hacia la bomba de tina de agua caliente para el control de temperatura. Conectar las mangueras restantes hacia el tanque de nitrógeno y al recipiente donde se recibirán los gases de fermentación respectivamente.

5. Esterilizar el termómetro con alcohol etílico al 96 % y en condiciones asépticas introducirlo al bioreactor en su entrada correspondiente.

6. Ajustar la temperatura del sistema al nivel requerido.

7. Una vez calibrado el medidor de pH, esterilizar el electrodo con alcohol etílico al 96% y en condiciones asépticas introducirlo al bioreactor en su entrada correspondiente.

8. Para mantener una atmósfera anaerobia burbujear nitrógeno al sistema durante 40 minutos, manteniendo abiertas las válvulas de entrada y salida de gases y completamente cerrada la toma de muestra.

9. Cerrar la válvula de entrada de nitrógeno y dejar abierta la de salida de gases para que salga el CO2 formado durante la fermentación.

10. Inocular en condiciones asépticas con el 10 % v/v de inóculo.

11. Ajustar el pH del sistema al valor requerido.

12. La barra de agitación debe ser de tipo ovular de 7 cm y el control de nivel de agitación en plancha debe colocarse siempre en el nivel 5.

Apéndice B-2

TOMA Y CONSERVACION DE MUESTRA

OBJETIVO:

Mostrar el procedimiento adecuado para la toma de muestra de los bioreactores, con el fin de que éstas conserven la propiedad de ser representativas. La composición de las muestras las hacen suceptibles de ser facilmente contaminadas con los microorganismos silvestres que pueden causar cambios significativos en las características de éstas.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Jeringa estéril de 5ml.
- Mechero Fisher.
- Tubo de ensayo estéril.
- Algodón.

INGREDIENTES:

- Alcohol al 96%.

PROCEDIMIENTO:

1. Limpiar el área cercana a la toma de muestra con un algodón impregnado de alcohol.
2. Encender el mechero con una flama alta.
3. Limpiar la manguera de toma de muestra con el algodón impregnado de alcohol.
4. Succionar medio con la jeringa y desechar esta muestra, flamear la aguja de la jeringa e introducirla nuevamente y succionar medio hasta llenarla y vaciar esta al tubo de ensaye. Colocar otra jeringa estéril que se utilizara en la siguiente muestra.
5. Rotular el tubo de la muestra especificando el nombre del experimento, el nombre de la muestra, hora de muestreo. Llenar con estos mismos datos la bitácora del experimento.
6. La muestra debe ser sellada con cinta parafilm y guardarla en congelación. De preferencia se recomienda dividir la muestra, la primera porción tal cual será usada para la determinación de biomasa. Lo otra porción es centrifugada para eliminar la biomasa y conservar en congelación el sobrenadante para el análisis de lactosa y ácidos.

APÉNDICE C
TÉCNICAS DE ANÁLISIS.

Apéndice C-1
DETERMINACIÓN DE LACTOSA
Determinación de azúcares totales (Miller, 1959)
(Método del ácido dinitrosalicílico DNS)

OBJETIVO:

Determinación de lactosa en la muestras obtenidas durante los experimentos.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Vasos de precipitado.
- Pipetas graduadas.
- Micropipetas.
- Agitador magnético.
- Baño María.
- Termómetro.
- Matraces aforados.
- Tubos de ensaye.
- Bureta.
- Probeta.
- Espectrofotómetro.

INGREDIENTES:

- Agua destilada.
- Ácido 3,5 dinitrosalicílico.
- Hidróxido de sodio.
- Tartrato de sodio y potasio.
- Fenol.
- Metabisulfito de sodio.
- Ácido clorhídrico.
- Fenolftaleína.
- Lactosa.

PROCEDIMIENTO:

Preparación del reactivo DNS:

1. Mezclar 1416 ml de agua destilada con 10.6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico y 19.8 g de lentejuelas de hidróxido de sodio, hasta disolver.
2. Agregar 306.0 g de tartrato de sodio y potasio.
3. Agregar 7.6 ml de fenol (el fenol se funde en baño María a 50°C para poder emplearlo).
4. Adicionar 8.3 g de metabisulfito de sodio.
5. Tomar 3 ml del reactivo DNS y titularlos con ácido clorhídrico 0.1 N usando como indicador Fenolftaleína.
6. La titulación deberá gastar de 5 a 6 ml de ácido clorhídrico, si se usa más de esta cantidad adicionar 2 g de hidróxido de sodio por cada ml de ácido gastado de más.

Preparación de curva estándar:

1. Preparar una solución de lactosa de 1 mg/ml y vaciar en 10 tubos desde 0.1, 0.2, ..., 1.0 ml.
2. Añadir agua destilada a cada tubo hasta completar 1.0 ml.
3. Añadir 3 ml de reactivo DNS a cada tubo.
4. Poner a hervir los tubos por 5 minutos en baño María.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Aforar a un volumen de 10 ml con agua destilada y mezclar bien.
7. El blanco se prepara de la misma forma pero con 1 ml de agua destilada en vez de la solución de lactosa.
8. Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm.
9. Los datos de concentración contra absorbancia deberán ser graficados para comprobar si son lineales y se correlacionan por medio de la siguiente ecuación:

Concentración (g/l) = m X + b
donde:
m = pendiente.
X = absorbancia.
b = ordenada al origen.

Análisis de muestras:

1. Centrifugar las muestras a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos y separar el sobrenadante.

2. Debido a la concentración de la muestra y al intervalo de precisión de la curva de calibración, se recomienda diluir las muestras por lo menos 1:100.

3. Colocar 1 ml de la muestra diluida en un tubo y realizar los paso 3 a 8.
4. Calcular la concentración con la curva de calibración y corregir por el factor de dilución empleado.

Apéndice C-2

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS PROPIÓNICO Y ACÉTICO.
CROMATOGRAFÍA DE GASES.

OBJETIVO:

Determinación de las concentraciones de los ácidos propiónico y acético en las muestras, por cromatografía de gases utilizando en la técnica de cuantificación por estándar interno.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Tubos de ensaye 13 x 100.
- 1 Micropipeta de 1 ml.
- 3 Matraces volumétricos de 100ml
- 3 Pipetas graduadas de 5 ml.
- 1 Jeringa de 1 microlitro, para cromatografía de gases, con punta biselada marca Alltech.
- Septa de 7/16 " de diámetro.
- Papel absorbente
- Balanza Analítica
- Centrífuga.
- Burbujómetro
- Cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, modelo Autosystem XLGC.
- Interface Perkin Elmer No. Mod. 950, para el registro de datos en computadora .
- Computadora con el software Turbochrom instalado, para el registro e integración de los cromatogramas.

INGREDIENTES:

- Agua destilada.
- Etanol al 96% (v/v).
- Ácido Propiónico (grado reactivo).
- Ácido Acético (grado reactivo).

PROCEDIMIENTO:

Preparación de la muestra:

1. Centrifugar las muestras a 5,000 R.P.M. durante 10 minutos.

2. Preparar 100ml de una solución con 30g/l de Ácido Propiónico y 15g/l de Ácido Acético. Esta solución se toma como estándar.

3. Preparar 100ml de una solución de Etanol en agua destilada al 3% (v/v). Esta solución se usará como el estándar interno.

4. En tubos de ensaye de 13 x 100 rotulados, agregar a cada uno 0.5ml de la muestra centrifugada y en otros tubos adicionar 0.5ml de la solución de ácido propiónico y ácido acético.

5. A todos los tubos agregarles 0.5ml de la solución de Etanol.

6. Tapar las muestras y mezclar.

7. Ajustar con la ayuda de un burbujómetro el flujo de nitrógeno a través de la columna a 3 ml/min.

8. Ajustar de la misma manera el flujo de aire e hidrógeno a 250 ml/min y 50 ml/min respectivamente.

9. Colocar una septa nueva en el puerto de inyección.

10. Encender el equipo, la interface y la computadora inicializando el software de análisis con el método de integración seleccionado.

11. Se abre la válvula para permitir el paso del nitrógeno al flujo previamente ajustado.

12. Programar en el panel de control del cromatógrafo las temperaturas para el puerto de inyección 250°C, para el horno 150°C y para el detector de ionización de flama 275°C.

13. Cuando las temperaturas se alcanzaron se procede abrir las válvulas de hidrógeno y aire y provocar la flama en el detector mediante el encendedor de resistencia del equipo.

14. Se deja estabilizar el equipo alrededor de 1 ½ hrs., dejando circular la mezcla de gases con el equipo encendido.

15. Una vez estabilizado el equipo se procede a inyectar los estándares y las muestras que se prepararon, para esto se toman 0.2 microlitros en una jeringa de inyección de 1 microlitro, secándose la punta con el papel absorbente.

16. Se coloca la aguja sobre el inyector y se hace la inyección rápidamente de forma que toda la muestra sea inyectada en un sólo paso. Inmediatamente se presiona el botón de iniciar el análisis (RUN METHOD)que se encuentra en el equipo.

17.El tiempo determinado para el análisis es de aproximadamente 5 min. y de acuerdo a los tiempos de retención en la columna se registran las diferentes componentes de la solución . Los tiempos observados para cada uno de los componentes de interés son 1.358 min. para el Etanol (estándar interno), 3.025min. para el ácido acético y 3.785 min. para el ácido propiónico.

18.Para inyectar una nueva muestra se enjuaga la jeringa con la misma muestra al menos 6 ó 7 veces hasta limpiar la jeringa, tomar entonces el volumen necesario para otra inyección.

Calculo de la concentración.

Para obtener la concentración de ácidos presentes en la muestra inyectada se hacen relaciones de proporción entre las áreas registradas en el integrador y las concentraciones de los estándares de los ácidos, que fueron preparados. El procedimiento es el siguiente.

1. Ajustar las áreas obtenidas de cada ácido mediante el área del estándar interno que se obtuvo tanto en la inyección de la muestra como el que se obtuvo en la inyección de la solución estándar de los ácidos.

Área corregida = (A1)*(AA)/(A2)

donde:
A1 es el área del estándar interno de la inyección de la solución preparada como estándar.
A2 es el área del estándar interno de la muestra a analizar.
AA es el área del ácido que se desea medir en la muestra inyectada.

Esta correción de las áreas de los ácidos obtenidas en el análisis permite eliminar el error de variaciones en el volumen de muestra inyectada en el cromatógrafo.

2. Con las áreas corregidas de cada ácido se determina la concentración de los ácidos mediante una relación entre las áreas obtenidas del estándar y su concentración a la que fue preparado. La relación es la siguiente.

Conc. de Ác. Propiónico (gr/lt) = (AAPM)*(30 gr/lt)/(AAPE)

donde:
AAPM es el área corregida del ácido propiónico de la inyección de la muestra .
AAPE es el área del ácido propiónico de la inyección del estándar preparado.

Conc. de Ác. Acético (gr/lt) = (AAAM)*(15gr/lt)/(AAAE)

donde:
AAAM es el área corregida del ácido acético en la muestra inyectada.
AAAE es el área del ácido acético en la inyección del estándar preparado.

Apéndice C-3
BIOMASA (PESO SECO y DENSIDAD OPTICA).

OBJETIVO:

Determinar la cantidad de biomasa en las muestras consideras. Se implementaron 2 métodos. El primero de ellos llamado peso seco es un método gravimétrico; el segundo método llamado densidad óptica es espectrofotométrico que consiste en medir las absorbancias de las soluciones y correlacionar estas al peso seco medido en ellas.

MATERIAL:

- Membranas de UF de 0.22 a 0.4 μm de diámetro de poro.
- Contenedor de membranas.
- Bomba de vacío.
- Estufa con control de temperatura +/- 2 °C.
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.
- Desecador.
- Vidrios de reloj.
- Pipetas volumétricas.
- Espectrofotómetro.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar una membrana en un vidrio de reloj e introducirla a un horno a 90 °C y secar la membrana hasta peso constante.

2. Filtrar a través de una membrana un volumen conocido de muestra y lavar los restos de medio haciendo pasar 10 ml de agua destilada por la membrana.

3. Someter la muestra lavada a deshidratación en un horno a 90°C durante dos horas y media.

4. Introducir la membrana seca al desecador por 30 min y posteriormente pesar.

CÁLCULOS:

Peso seco (g/l) = (P2 - P1) * 1000 / V

donde:

P2 Peso de la membrana con residuo seco.
P1 Peso inicial de la membrana.
V Volumen de la muestra en ml.

Otra técnica utilizada fue la determinación de biomasa por densidad óptica, está determinación se basa en correlacionar el peso seco a la absorbancia leída de las muestras en un espectrofotometro. En este caso la densidad óptica o absorbancia fue leída a 550ηm y con una dilución de las muestras de 1/16 en agua destilada, obteniéndose una funcionalidad lineal entre el peso seco y la absorbancia.

APENDICE D
PROGRAMAS DE CÓMPUTO.

Apéndice D-1
PROGRAMA CL3765.FOR

Este programa fue construido para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (3-3 a 3-6) que representan el modelo de la cinética de la fermentación propiónica con células libres así como para optimizar los parámetros cinéticos con la aplicación de la subrutina GREG. El sistema de ecuaciones fue resuelto utilizando el método de Runge - Kuta de 4to. orden.

```
$DEBUG
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      EXTERNAL MODEL
      COMMON/CONIN/SL,XL,PL,AL
      COMMON/INPARA/TTP,DTP
      DIMENSION OBS(4,15),PAR(8),BNDLW(8),BNDUP(8),CHMAX(8)
      DIMENSION DSC(915),ISC(64),IOBS(4,15),IDET(1),DEL(8)
C     PARAMETROS DE INTEGRACION
      WRITE(*,*)'TIEMPO TOTAL DE CORRIDA'
      READ(*,*)TTP
      WRITE(*,*)'INTERVALO DE INTEGRACION'
      READ(*,*)DTP
C     ENTRADA DE CONDICIONES INICIALES
      WRITE(*,*)'CUAL ES LA CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO'
      READ(*,*)SL
      WRITE(*,*)'CUAL ES LA CONCENTRACION INICIAL DE BIOMASA'
      READ(*,*)XL
      WRITE(*,*)'CUAL ES LA CONCENTRACION INICIAL DE ACIDO PROPIONICO'
      READ(*,*)PL
      WRITE(*,*)'CUAL ES LA CONCENTRACION INICIAL DE ACIDO ACETICO'
      READ(*,*)AL
C     ENTRADA DE LOS DATOS EXPERIMENTALES
C     (LACTOSA-BIOMASA-A PROPIONICO-A ACETICO )
      DATA OBS/53.50,0.678,0.000,0.000,
     *     51.75,0.706,0.757,0.907,
     *     50.90,0.942,1.525,0.988,
     *     45.10,3.124,2.869,1.535,
     *     34.15,6.405,4.426,3.133,
     *     26.07,8.607,13.21,9.730,
     *     18.65,9.950,20.16,12.22,
     *     12.15,11.07,24.53,13.50,
     *     8.290,11.23,29.18,15.02,
     *     4.870,11.36,32.74,17.45,
     *     1.245,10.88,32.69,17.09,
     *     1.095,10.21,32.55,17.09,
     *     0.516,9.505,32.60,16.86,
     *     0.186,8.875,32.84,17.06,
     *     0.194,8.520,32.84,17.06 /
C     ENTRADA DE LOS DATOS NECESARIOS PARA GREG
C     LIMITES DE LOS PARAMETROS
      NOB=60
      NPAR=8
      BNDLW(1)=0.0001D0
      BNDUP(1)=+1.0D0
      BNDLW(2)=0.0001D0
      BNDUP(2)=50.0D0
      BNDLW(3)=0.0001D0
      BNDUP(3)=32.0D0
```

```
      BNDLW(4)=0.0001D0
      BNDUP(4)=10.0D0
      BNDLW(5)=0.0001D0
      BNDUP(5)=1.0D0
      BNDLW(6)=0.0001D0
      BNDUP(6)=1.0D0
      BNDLW(7)=0.30
      BNDUP(7)=0.40
      BNDLW(8)=0.0001D0
      BNDUP(8)=1.0D0
      DO 300 I=1,NPAR
      CHMAX(I)=20.0D0
      DEL(I)=-1.0D-2
  300 CONTINUE
      MISC=64
      MDSC=915
C     ENTRADA DE VALORES INICIALES PARA LOS PARAMETROS
C     TASA ESPECIFICA DE CRECIMIENTO MAXIMA.
      PAR(1)=0.1859459
C     CONSTANTE DE SATURACION
      PAR(2)=47.0
C     CONSTANTE DE INHIBICION
      PAR(3)=32.0
C     COEFICIENTE DE CONSUMO ASOCIADO AL CRECIMIENTO
      PAR(4)=2.628371
C     CONSTANTE DE MANTENIMIENTO O NO ASOCIADO
      PAR(5)=0.0001
C     COEFICIEN DE PRODUCCION DE PROPIONICO ASOCIADO AL CONSUMO
      PAR(6)=0.605132
C     COEFICIEN DE PRODUCCION DE ACETICO ASOCIADO AL CONSUMO
      PAR(7)=0.35
C     COSTANTE DE MORTANDAD
      PAR(8)=0.0374889
C     TOLERANCIAS
      RPTOL=1.0D-5
      RSTOL=1.0D-1
      VPIV=1.0D-2
      APIV=1.0D-2
C     INICIALIZACION DEL ARREGLO ISC
      ISC(1)=1
      ISC(2)=20
      ISC(3)=1
      ISC(4)=25
      ISC(5)=3
      ISC(6)=15
      ISC(7)=1
      ISC(8)=4
      ISC(9)=1
C     ENTRADA DE LA ESTRUCTURA DE LOS DATOS
      IDET(1)=4
      DO 400 I=1,15
      DO 500 J=1,IDET(1)
      IOBS(J,I)=1
  500 CONTINUE
  400 CONTINUE
C     LLAMADA AL PAQUETE DE REGRESION
      CALL GREG(NOB,OBS,NPAR,PAR,BNDLW,BNDUP,CHMAX,DEL,MDSC,DSC,
     *          MISC,ISC,IOBS,IDET,EMOD,VPIV,APIV,RPTOL,RSTOL,MODEL)
C     FIN DEL PROGRAMA PRINCIPAL
      STOP
      END

C     INICIO DEL SUBRUTINA MODEL
      SUBROUTINE MODEL(PAR,F,NOB,NPAR,IDER,DERIV,MINFO)
C     ESTE PROGRAMA LO DEDICO A TI LINDA
C     ESTA SUBRUTINA RESUELVE EL CONJUNTO DE ECUACIONES.
C     DIFERENCIALES ORDINARIAS
C     POR EL METODE RUNGE-KUTA DE CUARTO ORDEN
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONIN/SL,XL,PL,AL
```

```
      COMMON/INPARA/TTP,DTP
C     DIMENCIONAMIENTO DE ARREGLOS
      DIMENSION X(150000),S(150000),P(150000),A(150000),T(100000)
      DIMENSION PAR(8),F(4,15)
C     PARAMETROS DE INTEGRACION
      TT=TTP
      DT=DTP
      NK=TT/DT
C     ENTRADA DE CONDICIONES INICIALES
      S(1)=SL
      X(1)=XL
      P(1)=PL
      A(1)=AL
      F(1,1)=S(1)
      F(2,1)=X(1)
      F(3,1)=P(1)
      F(4,1)=A(1)
      KR=1
      TR=0.0
      T(1)=0.0
C     METODO DE RUNGE-KUTA PARA CUATRO ECUACIONES
      DO 100 K=2,NK
      XN=X(K-1)
      SN=S(K-1)
      PN=P(K-1)
      AN=A(K-1)
C     PRIMER PASO
      X0=DT*F1(PAR,XN,SN,PN,AN)
      S0=DT*F2(PAR,XN,SN,PN,AN)
      P0=DT*F3(PAR,XN,SN,PN,AN)
      A0=DT*F4(PAR,XN,SN,PN,AN)
C     SEGUNDO PASO
      X1=DT*F1(PAR,XN+X0/2.0,SN+S0/2.0,PN+P0/2.0,AN+A0/2.0)
      S1=DT*F2(PAR,XN+X0/2.0,SN+S0/2.0,PN+P0/2.0,AN+A0/2.0)
      P1=DT*F3(PAR,XN+X0/2.0,SN+S0/2.0,PN+P0/2.0,AN+A0/2.0)
      A1=DT*F4(PAR,XN+X0/2.0,SN+S0/2.0,PN+P0/2.0,AN+A0/2.0)
C     TERCER PASO
      X2=DT*F1(PAR,XN+X1/2.0,SN+S1/2.0,PN+P1/2.0,AN+A1/2.0)
      S2=DT*F2(PAR,XN+X1/2.0,SN+S1/2.0,PN+P1/2.0,AN+A1/2.0)
      P2=DT*F3(PAR,XN+X1/2.0,SN+S1/2.0,PN+P1/2.0,AN+A1/2.0)
      A2=DT*F4(PAR,XN+X1/2.0,SN+S1/2.0,PN+P1/2.0,AN+A1/2.0)
C     CUARTO PASO
      X3=DT*F1(PAR,XN+X2,SN+S2,PN+P2,AN+A2)
      S3=DT*F2(PAR,XN+X2,SN+S2,PN+P2,AN+A2)
      P3=DT*F3(PAR,XN+X2,SN+S2,PN+P2,AN+A2)
      A3=DT*F4(PAR,XN+X2,SN+S2,PN+P2,AN+A2)
C     ACTUALIZACION
      X(K)=XN+(1.0/6.0)*(X0+2.0*X1+2.0*X2+X3)
      S(K)=SN+(1.0/6.0)*(S0+2.0*S1+2.0*S2+S3)
      P(K)=PN+(1.0/6.0)*(P0+2.0*P1+2.0*P2+P3)
      A(K)=AN+(1.0/6.0)*(A0+2.0*A1+2.0*A2+A3)
C     CONTADOR DEL TIEMPO PARA MUESTREOS DE CADA CINCO HORAS
      T(K)=K*DT
      TF=T(K)-TR
      IF(TF.EQ.5.0) THEN
      TR=T(K)
      KR=KR+1
      F(1,KR)=S(K)
      F(2,KR)=X(K)
      F(3,KR)=P(K)
      F(4,KR)=A(K)
      ELSE
      ENDIF
C     TERMINO DEL CICLO
  100 CONTINUE
C     TERMINO DE LA SURUTINA MODEL
      RETURN
      END
C     FUNCION F1 BALANCE SOBRE BIOMASA
      FUNCTION F1(PAR,X,S,P,A)
```

```
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      DIMENSION PAR(8)
      T1=PAR(1)*S*X/(PAR(2)+S)
      T2=PAR(3)/(PAR(3)+P)
      F1=T1*T2-PAR(8)*X
      RETURN
      END
C     FUNCION F2 BALANCE SOBRE LA LACTOSA
      FUNCTION F2(PAR,X,S,P,A)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      DIMENSION PAR(8)
      T1=PAR(1)*S*X/(PAR(2)+S)
      T2=PAR(3)/(PAR(3)+P)
      T3=PAR(4)*T1*T2
      T4=PAR(5)*X
      F2=-T3-T4
      RETURN
      END
C     FUNCION F3 BALANCE SOBRE ACIDO PROPIONICO
      FUNCTION F3(PAR,X,S,P,A)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      DIMENSION PAR(8)
      T1=PAR(1)*S*X/(PAR(2)+S)
      T2=PAR(3)/(PAR(3)+P)
      T3=PAR(4)*T1*T2
      T4=PAR(5)*X
      F3=PAR(6)*(T3+T4)
      RETURN
      END
C     FUNCION F4 BALANCE SOBRE ACIDO ACETICO
      FUNCTION F4(PAR,X,S,P,A)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      DIMENSION PAR(8)
      T1=PAR(1)*S*X/(PAR(2)+S)
      T2=PAR(3)/(PAR(3)+P)
      T3=PAR(4)*T1*T2
      T4=PAR(5)*X
      F4=PAR(7)*(T3+T4)
      RETURN
      END
```

Apéndice D-2
PROGRAMA DIFF4.FOR

Este programa fue construido para resolver el problema de difusión de un soluto hacia esferulas de soporte que se encuentran dispersas en una solución agitada. El modelo esta descrito por las ecuaciones 3-13 a 3-21, que son resueltas en este programa por el método de diferencias finitas con discretización en el tiempo y el espacio.

```
$DEBUG
   IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,P-Z)
   DIMENSION C(1000,1000),F(1000,1000),DC(1000)
   ERROR=0.00001
C  ENTRADA DE CONDICIONES DE OPERACION
C  VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO EN ML
   VL=200/1.0D06
C  VOLUMEN DE SOPORTE EN ML
   VI=79/1.0D06
C  PASO EN EL TIEMPO
   DT=0.001
C  PASO EN EL ESPACIO
   DX=0.02
   NK=1.0/DX
   T=0
   tr=0
C  PERFIL INICIAL
   C(1,NK)=1.0
   DO 110 I=1,NK-1
   C(1,I)=0.0
 110 CONTINUE
 400 T=T+DT
C CONTADOR DE TIEMPO
   TMIN=T*0.0014*0.0014*60/2.17073D-06
   DIT=TMIN-TR
C TOMA DE LECTURA EN EL TIEMPO
   IF((DIT.GT.1.0).OR.(TR.EQ.0.0)) THEN
   TR=TMIN
C          SALIDA DE LA CONCETRACIÓN EN LA SOLUCIÓN Y EL TIEMPO
   WRITE(*,*)'SUP',C(1,NK)*50.75,TMIN
   ELSE
   END IF
   IF(TMIN.GT.22.0) THEN
   GOTO 700
   ELSE
   END IF
C  PERFIL PROPUESTO EN PASO EN EL TIEMPO ACTUAL
   DO 120 I=1,NK
   C(2,I)=C(1,I)
 120 CONTINUE
C   MÉTODO DE SOLUCIÓN
C   LLENADO DEL JACOBIANO
C   LLENADO DEL PRIMER RENGLON
 500 F(1,1)=-(1.0/DT+1.0/(DX*DX))
   F(1,2)=0.0
   F(1,3)=1.0/(DX*DX)
   DO 10,J=4,NK
   F(1,J)=0.0
  10 CONTINUE
   T1=-(1.0/DT+1.0/(DX*DX))*C(2,1)
   T2=(1.0/(DX*DX))*C(2,3)
   T3=C(1,1)/DT
   F(1,NK+1)=-(T1+T2+T3)
C  LLENADO DEL ULTIMO RENGLON
   DO 20 J=1,NK-2
   F(NK,J)=0.0
```

```
 20 CONTINUE
   F(NK,NK-1)=(3.0*VI/(VL*DX))
   F(NK,NK)=-((3.0*VI/(VL*DX))+1.0/DT)
   T3=(3.0*VI/(VL*DX))*C(2,NK-1)
   T4=-((3.0*VI/(VL*DX))+1.0/DT) *C(2,NK)
   T5=C(1,NK)/DT
   F(NK,NK+1)=-(T3+T4+T5)
C   LLENADO DE UN RENGLON INTERMEDIO
   DO 30 I=2,NK-1
   DO 40 J=1,NK
   IF(J.EQ.I-1) THEN
     F(I,J)=(1.0/(DX*DX)-1.0/(I*DX*DX))
   ELSE
     IF(J.EQ.I) THEN
       F(I,J)=-(1.0/DT+2.0/(DX*DX))
      ELSE
        IF(J.EQ.I+1) THEN
          F(I,J)=(1.0/(DX*DX)+1.0/(I*DX*DX))
         ELSE
         F(I,J)=0.0
        END IF
      END IF
    END IF
  40 CONTINUE
  30 CONTINUE
    DO 50 I=2,NK-1
    T7=(1.0/(DX*DX)-1.0/(I*DX*DX))*C(2,I-1)
    T8=-(1.0/DT+2.0/(DX*DX))*C(2,I)
    T9=(1.0/(DX*DX)+1.0/(I*DX*DX))*C(2,I+1)+C(1,I)/DT
    F(I,NK+1)=-(T7+T8+T9)
  50 CONTINUE
C   LLAMADO DE LA SUBRUTINA PARA LA SOLUCIÓN DEL JACOBIANO
    CALL GAUS(F,NK,DC)
C   ACTUALIZACION DE LAS CONCENTRACIONES
    DO 170 I=1,NK
    C(2,I)=C(2,I)+DC(I)
 170 CONTINUE
C   VERIFICACION DE CONVERGENCIA
    RMIN=ABS(DC(1))
    DO 230 N=2,NK
    REF=ABS(DC(N))
    IF(REF.LT.RMIN)THEN
    RMIN=REF
    ELSE
    END IF
 230 CONTINUE
    IF(RMIN.LT.ERROR) THEN
    DO 130 I=1,NK
    C(1,I)=C(2,I)
 130 CONTINUE
    GO TO 400
    ELSE
    GO TO 500
    END IF
 700 STOP
    END
C   |||||°°°°°°°SUBRUTINA PARA RESOLVER EL JACOBIANO °°°°°°°|||||
    SUBROUTINE GAUS(F,NK,DC)
    IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
    DIMENSION F(1000,1000),DC(1000)
    DO 100 I=1,NK
    PIVOT=F(I,I)
    DO 200 J=1,NK+1
    F(I,J)=F(I,J)/PIVOT
 200 CONTINUE
    DO 300 K=1,NK
    IF(K.EQ.I) THEN
    ELSE
    RMUL=F(K,I)
    DO 400 K1=1,NK+1
```

```
  F(K,K1)=F(K,K1)-F(I,K1)*RMUL
400 CONTINUE
  END IF
300 CONTINUE
100 CONTINUE
  DO 500 I=1,NK
  DC(I)=F(I,NK+1)
500 CONTINUE
    RETURN
    END
```

Apéndice D-3
PROGRAMA CLCI3555.FOR

Este programa fue construido para resolver el modelo de difusión y reacción que representa la fermentación propiónica con células inmovilizadas en esferulas de poligalacturonato de calcio en un reactor tipo tanque perfectamente agitado. El modelo esta representado por las ecuaciones 3-22 a 3-47 que fueron resueltas utilizando el método de líneas con discretización en la coordenada radial.

MODELO CON CRECIMIENTO.

```
$DEBUG
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,P-Z)
      COMMON/CONDI/R0,DX
      COMMON/CONIN/S0,X0,
      DIMENSION S(1000),P(1000),X(1000)
      DIMENSION  TAP(1000),TRP(1000),TAS(1000),TRS(1000)
      DIMENSION F(2,15)
      OPEN(1,FILE="TYE.RES")
C     ENTRADA DE CONDICIONES DE OPERACION
C     VOLUMEN TOTAL DE REACCION
      VT1=1750.0
      VT=VT1/1.0D06
C     VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO EN ML
      VL1=1500.0
      VL=VL1/1.0D06
C     CUAL ES EL FLUJO DE ALIMENTACION ML/MIN
      F0=0.0
      FR=F0*60.0/1.0D06
C     CUAL ES EL VOLUMEN DE SOPORTE EN ML
      VI1=250.0
      VI=VI1/1.0D06
C     CUAL ES EL RADIO DE LA ESFERULA EN MM
      R01=1.40
      R0=R01/1000.0
C     CUAL ES EL INCREMENTO EN TIEMPO ADIMENCIONAL'
      DT=0.0001
C     CUAL ES EL INCREMENTO EN LA DIRECCION RADIAL'
      DX=0.01
      NK=1.0/DX
C     CUAL ES EL NUMERO MAXIMO DE ITERACIONES'
      NMAX=750000
C     DIFUSIVIDAD DE LACTOSA
      DES=2.19D-06
C     ENTRADA DE CONCENTRACIONES INICIALES
C     LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE LACTOSA'
      S0=37.17
      S(NK)=S0/S0
      P0=1.6
      P(NK)=P0/S0
      X0=7.0
      X(NK)=X0/X0
C     ENTRADA DE PERFILES INICIALES
C     LLENADO DEL PERFIL INICIAL
      DO 200 K=NK-1,1,-1
      S(K)=S(NK)
      X(K)=X(NK)
      P(K)=P(NK)
  200 CONTINUE
C     METODO DE RUNGE-KUTA PARA UNA ECUACIONES
C     CONTADOR DEL TIEMPO
```

```
      ND=0
      KR=1
      KT=0
   20 KT=KT+1
C     CICLO PARA LA EVALUACION RADIAL
      DO 100 K=NK-1,1,-1
      IF(K.EQ.1) THEN
      X1=X(K+1)
      S1=S(K+1)
      P1=P(K+1)
      X2=X(K+1)
      S2=S(K+1)
      P2=P(K+1)
      X3=X(K+1)
      S3=S(K+1)
      P3=P(K+1)
      ELSE
      X1=X(K-1)
      S1=S(K-1)
      P1=P(K-1)
      X2=X(K)
      S2=S(K)
      P2=P(K)
      X3=X(K+1)
      S3=S(K+1)
      P3=P(K+1)
      END IF
C     PRIMER PASO
      X20=DT*BIO(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      S20=DT*SUS(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      P20=DT*PROP(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      T1S20=(S20/DT)*((K*DX)**2)
      T1P20=(P20/DT)*((K*DX)**2)
C     SEGUNDO PASO
      X21=DT*BIO(X1,X2+X20/2.0,X3,S1,S2+S20/2.0,S3,
     *     P1,P2+P20/2.0,P3,K)
      S21=DT*SUS(X1,X2+X20/2.0,X3,S1,S2+S20/2.0,S3,
     *     P1,P2+P20/2.0,P3,K)
      P21=DT*PROP(X1,X2+X20/2.0,X3,S1,S2+S20/2.0,S3,
     *     P1,P2+P20/2.0,P3,K)
      T2S21=(S21/DT)*((K*DX)**2)
      T2P21=(P21/DT)*((K*DX)**2)
C     TERCER PASO
      X22=DT*BIO(X1,X2+X21/2.0,X3,S1,S2+S21/2.0,S3,
     *     P1,P2+P21/2.0,P3,K)
      S22=DT*SUS(X1,X2+X21/2.0,X3,S1,S2+S21/2.0,S3,
     *     P1,P2+P21/2.0,P3,K)
      P22=DT*PROP(X1,X2+X21/2.0,X3,S1,S2+S21/2.0,S3,
     *     P1,P2+P21/2.0,P3,K)
      T3S22=(S22/DT)*((K*DX)**2)
      T3P22=(P22/DT)*((K*DX)**2)
C     CUARTO PASO
      X23=DT*BIO(X1,X2+X22,X3,S1,S2+S22,S3,P1,P2+P22,P3,K)
      S23=DT*SUS(X1,X2+X22,X3,S1,S2+S22,S3,P1,P2+P22,P3,K)
      P23=DT*PROP(X1,X2+X22,X3,S1,S2+S22,S3,P1,P2+P22,P3,K)
      T4S23=(S23/DT)*((K*DX)**2)
      T4P23=(P23/DT)*((K*DX)**2)
C     ACTUALIZAR
      X(K)=X2+(1.0/6.0)*(X20+2.0*X21+2.0*X22+X23)
      S(K)=S2+(1.0/6.0)*(S20+2.0*S21+2.0*S22+S23)
      P(K)=P2+(1.0/6.0)*(P20+2.0*P21+2.0*P22+P23)
      TAS(K)=(1.0/6.0)*(T1S20+2.0*T2S21+2.0*T3S22+T4S23)
      TAP(K)=(1.0/6.0)*(T1P20+2.0*T2P21+2.0*T3P22+T4P23)
      TRS(K)=RELACTO(X1,X(K),X3,S1,S(K),S3,P1,P(K),P3,K)
      TRP(K)=REPROP(X1,X(K),X3,S1,S(K),S3,P1,P(K),P3,K)
C     TERMINO DEL CICLO RADIAL
  100 CONTINUE
C     PROCEDIMIENTO PARA ACTUALIZAR CONCENTRACIONES EN EL MEDIO LIQUIDO

C     PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE ACUMULACION DE LACTOSA
```

```
C   PARA BALANCE DE MASA
    SUM1=0
    DO 500 J=3,NK-3,+2
    SUM1=SUM1+TAS(J)
 500 CONTINUE
    SUM2=0
    DO 600 I=2,NK-2,+2
    SUM2=SUM2+TAS(I)
 600 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE ACUMULACION DE LACTOSA
    RINTAL=(1.0-0.0)*(TAS(1)+4.0*SUM1+2.0*SUM2+TAS(NK-1))/(3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE REACCION DE LACTOSA
C   PARA BALANCE DE MASA
    SUM11=0
    DO 501 J=3,NK-3,+2
    SUM11=SUM11+TRS(J)
 501 CONTINUE
    SUM22=0
    DO 601 I=2,NK-2,+2
    SUM22=SUM22+TRS(I)
 601 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE REACCION DE LACTOSA
    RINTRL=(1.0-0.0)*(TRS(1)+4.0*SUM11+2.0*SUM22+TRS(NK-1))/
     *     (3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE ACUMULACION DE PROPIONICO
C   PARA BALANCE DE MASA
    SUM33=0
    DO 502 J=3,NK-3,+2
    SUM33=SUM33+TAP(J)
 502 CONTINUE
    SUM44=0
    DO 602 I=2,NK-2,+2
    SUM44=SUM44+TAP(I)
 602 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE ACUMULACION DE PROPIONICO
    RINTAP=(1.0-0.0)*(TAP(1)+4.0*SUM33+2.0*SUM44+TAP(NK-1))/
     *     (3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE REACCION DE PROPIONICO
C   PARA BALANCE DE MASA
    SUM55=0
    DO 503 J=3,NK-3,+2
    SUM55=SUM55+TRP(J)
 503 CONTINUE
    SUM66=0
    DO 603 I=2,NK-2,+2
    SUM66=SUM66+TRP(I)
 603 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE REACCION DE PROPIONICO
    RINTRP=(1.0-0.0)*(TRP(1)+4.0*SUM55+2.0*SUM66+TRP(NK-1))/
     *     (3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTOS DE ACTUALIZACION
C   PROCEDIMIENTO DE ACTUALIZACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA
    T11=3.0*VI*RINTAL/VL
    T22=3.0*VI*RINTRL/VL
    S(NK)=S(NK)+DT*(-T11-T22)
C   PROCEDIMIENTO PARA ACTUALIZACION DE PROPIONICO
    T33=3.0*VI*RINTAP/VL
    T44=3.0*VI*RINTRP/VL
    P(NK)=P(NK)+DT*(T44-T33)
C   CONTEO DE TIEMPO
    TIEM=KT*DT*R0*R0/DES
    KTC=KT-KR
C   REGISTRO DE PERFILES EN EL MEDIO AL ARCHIVO PIENSO.RES
    IF((KTC.EQ.53140).OR.(KT.EQ.KR)) THEN
    KR=KT
    ND=ND+1
    F(1,ND)=S(NK)*S0
    F(2,ND)=P(NK)*S0
    WRITE(*,*)'LACTOSA A PROPIONICO',F(1,ND),F(2,ND)
    WRITE(*,*)'TIEMPO',TIEM
```

```
      su=0.0
      do 310 i=1,nk
      su=su+x(i)*x0
310 continue
      xpro=su/nk
      write(*,*)'xpro',xpro
      write(1,*)'x,s,p'
      write(1,*)XPRO,S(NK)*37.17,P(NK)*37.17
      WRITE(1,*)TIEM
      ELSE
      END IF
C     TERMINACION DE ACTUALIZACION EN EL MEDIO
C     REGRESAR A HACER OTRA ITERACION EN EL TIEMPO
      IF(KT.EQ.NMAX) THEN
      GOTO 30
      ELSE
      END IF
C     TERMINO DE UN CICLO EN EL TIEMPO
      GOTO 20
C     TERMINACION DE LA SUBRUTINA PRINCIPAL
 30   CLOSE(1)
      STOP
      END
C     FUNCION DEL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DENTRO DE LA ESFERULA
      FUNCTION BIO(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/R0,DX
      COMMON/CONIN/S0,X0
C     PARAMETROS CINETICOS
      RMAX=0.1861457
      RKS=5.342592
      RKP=32.2
      RM=0.000001
      RKD=0.1090149
      YSX=2.772528
      YPS=0.6034134
      DES=2.603866D-06
      TH1=RMAX*R0*R0/DES
      TH2=RM*R0*R0/DES
      TH3=RKD*R0*R0/DES
      T1=S0*S2*X2/(RKS+S0*S2)
      T2=RKP/(RKP+S0*P2)
      BIO=TH1*T1*T2-TH3*X2
      RETURN
      END
C     FUNCION DEL CONSUMO DE LACTOSA DENTRO DE LA ESFERULA
      FUNCTION SUS(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/R0,DX
      COMMON/CONIN/S0,X0
C     PARAMETROS CINETICOS
      RMAX=0.1861457
      RKS=5.342592
      RKP=32.2
      RM=0.000001
      RKD=0.1090149
      YSX=2.772528
      YPS=0.6034134
      DES=2.603866D-06
      TH1=RMAX*R0*R0/DES
      TH2=RM*R0*R0/DES
      TH3=RKD*R0*R0/DES
      T1=TH1*S2*X0*X2/(RKS+S0*S2)
      T2=RKP/(RKP+S0*P2)
      T3=TH2*X0*X2/S0
      T4=YSX*(T1*T2)+T3
      T5=(S3-2.0*S2+S1)/(DX*DX)
      T6=2.0*(S3-S1)/(K*DX*DX)
      T7=T5+T6
      SUS=T7-T4
```

```
      RETURN
      END
C     FUNCION DE FORMACION DE PROPIONICO DENTRO DEL PELLET
      FUNCTION PROP(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/R0,DX
      COMMON/CONIN/S0,X0
C     PARAMETROS CINETICOS
      RMAX=0.1861457
      RKS=5.342592
      RKP=32.2
      RM=0.000001
      RKD=0.1090149
      YSX=2.772528
      YPS=0.6034134
      DES=2.603866D-06
      TH1=RMAX*R0*R0/DES
      TH2=RM*R0*R0/DES
      TH3=RKD*R0*R0/DES
      RD=1.0
      T1=TH1*S2*X0*X2/(RKS+S0*S2)
      T2=RKP/(RKP+S0*P2)
      T3=TH2*X0*X2/S0
      T4=YSX*(T1*T2)+T3
      T5=(P3-2.0*P2+P1)/(DX*DX)
      T6=2.0*(P3-P1)/(K*DX*DX)
      T7=RD*(T5+T6)
      PROP=T7+YPS*T4
      RETURN
      END
C     FUNCION PARA EVALUAR EL TERMINO REACTIVO DE LA LACTOSA
      FUNCTION RELACTO(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/R0,DX
      COMMON/CONIN/S0,X0
C     PARAMETROS CINETICOS
      RMAX=0.1861457
      RKS=5.342592
      RKP=32.2
      RM=0.000001
      RKD=0.1090149
      YSX=2.772528
      YPS=0.6034134
      DES=2.603866D-06
      TH1=RMAX*R0*R0/DES
      TH2=RM*R0*R0/DES
      TH3=RKD*R0*R0/DES
      T1=TH1*S2*X0*X2/(RKS+S0*S2)
      T2=RKP/(RKP+S0*P2)
      T3=TH2*X0*X2/S0
      T4=YSX*(T1*T2)+T3
      RELACTO=T4*((K*DX)**2)
      RETURN
      END
C     FUNCION PARA EVALUAR EL TERMINO REACTIVO DEL PROPIONICO
      FUNCTION REPROP(X1,X2,X3,S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/R0,DX
      COMMON/CONIN/S0,X0
C     PARAMETROS CINETICOS
      RMAX=0.1861457
      RKS=5.342592
      RKP=32.2
      RM=0.000001
      RKD=0.1090149
      YSX=2.772528
      YPS=0.6034134
      DES=2.603866D-06
      TH1=RMAX*R0*R0/DES
      TH2=RM*R0*R0/DES
```

```
TH3=RKD*R0*R0/DES
T1=TH1*S2*X0*X2/(RKS+S0*S2)
T2=RKP/(RKP+S0*P2)
T3=TH2*X0*X2/S0
T4=YSX*(T1*T2)+T3
REPROP=YPS*T4*((K*DX)**2)
RETURN
END
```

Apéndice D-4
PROGRAMA REAINMOP.FOR

Este programa fue construido para resolver el modelo de difusión y reacción que representa la fermentación propiónica con células inmovilizadas en esferulas de poligalacturonato de calcio en un reactor tipo tanque perfectamente agitado. Utilizando como cinética intrínseca la ecuación de Michaelis Menten sin crecimiento de biomasa. El modelo esta representado por las ecuaciones 3-49 a 3-52 que fueron resueltas utilizando el método de líneas con discretización en la coordenada radial.

MODELO SIN CRECIMIENTO.

```
$DEBUG
   IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
   EXTERNAL MODEL
   DIMENSION OBS(15),PAR(2),BNDLW(2),BNDUP(2),CHMAX(2),DEL(2)
   DIMENSION DSC(81),ISC(12)
C  LLENANDO LOS ARGUMENTOS PARA GREG
   MDSC=81
   MISC=12
   NOB=15
   NPAR=2
C  ENTRADA DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.
   DATA OBS/37.17,34.81,32.82,31.43,28.81,26.75,22.96,
   *     20.52,19.41,16.73,15.02,13.63,11.86,9.81,9.36/
C  ENTRADA DE LOS VALORES INICIALES DE GREG
C  MODULO DE THIELE
   PAR(1)=0.5935535
C  CONSTANTE DE SATURACION
   PAR(2)=6.641459
C  INICIALIZACION DEL ARREGLO ISC
   ISC(1)=1
   ISC(2)=10
   ISC(3)=0
C  LLAMADA A LA SUBRUTINA DE OPTIMIZACION GREG
   CALL GREG(NOB,OBS,NPAR,PAR,BNDLW,BNDUP,CHMAX,DEL,MDSC,DSC,
   *     MISC,ISC,IOBS,IDET,EMOD,VPIV,APIV,RPTOL,RSTOL,MODEL)
C  TERMINO DEL PROGRAMA PRINCIPAL
   STOP
   END
C  SUBROUTINA PARA RESOLUCION DE LA MODELO

   SUBROUTINE MODEL(PAR,F,NOB,NPAR,IDER,DERIV,MINFO)

C  ESTE PROGRAMA ESTA DEDICADO AL PRIMERO QUE LLEGUE
C  ESTA SUBROUTINA SE CONSTRUYO PARA SIMULAR LA FERMENTACIàN
C  PROPIONICA CON CELULAS INMOVILIZADAS.
C  EN ESTE PROGRAMA SE UTILIZA EL METODO DE LINEAS PARA EVALUAR
C  LAS ECUACIONES DIFERENCIALES PARCIALES.  LA ACTUALIZACIàN
C  DE LAS CONCETRACIONES EN EL MEDIO SE REALIZAN POR BALANCES ENTRE LAS
C  ESPECIES EN EL MEDIO Y EN LAS ESFERULAS DE SOPORTE.
   IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,P-Z)
   COMMON/CONDI/DX
   COMMON/CONIN/S0
   DIMENSION S(1000),TAS(1000),TRS(1000)
   DIMENSION PAR(2),F(15)

C  ENTRADA DE CONDICIONES DE OPERACION
C  VOLUMEN TOTAL DE REACCION
   VT1=1750.0
```

```
      VT=VT1/1.0D06
C     VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO EN ML
      VL1=1500.0
      VL=VL1/1.0D06
C     CUAL ES EL FLUJO DE ALIMENTACION ML/MIN
      F0=0.0
      FR=F0*60.0/1.0D06
C     CUAL ES EL VOLUMEN DE SOPORTE EN ML
      VI1=250.0
      VI=VI1/1.0D06
C     CUAL ES EL RADIO DE LA ESFERULA EN MM
      R01=1.40
      R0=R01/1000.0
C     CUAL ES EL INCREMENTO EN TIEMPO ADIMENCIONAL'
      DT=0.0001
C     CUAL ES EL INCREMENTO EN LA DIRECCION RADIAL'
      DX=0.01
      NK=1.0/DX
C     CUAL ES EL NUMERO MAXIMO DE ITERACIONES'
      NMAX=745000
C     DIFUSIVIDAD DE LACTOSA
      DES=2.19D-06
C     ENTRADA DE CONCENTRACIONES INICIALES
C     LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE LACTOSA'
      S0=37.17
      S(NK)=S0/S0
C     ENTRADA DE PERFILES INICIALES
C     CONCENTRACION ADIMENSIONAL DE LACTOSA EN LA ESFERULA
      SE0=1.0
C     LLENADO DEL PERFIL INICIAL
      DO 200 K=NK-1,1,-1
      S(K)=SE0
  200 CONTINUE
C     METODO DE RUNGE-KUTA PARA UNA ECUACIONES
C     CONTADOR DEL TIEMPO
      NC=0
      KR=1
      KR1=1
      KT=0
      KT1=0
   20 KT=KT+1
      KT1=KT1+1
C     CICLO PARA LA EVALUACION RADIAL
      DO 100 K=NK-1,1,-1
      IF(K.EQ.1) THEN
      S1=S(K+1)
      S2=S(K+1)
      S3=S(K+1)
      ELSE
      S1=S(K-1)
      S2=S(K)
      S3=S(K+1)
      END IF
C     PRIMER PASO
      S20=DT*SUS(PAR,S1,S2,S3,K)
      T1S20=(S20/DT)*((K*DX)**2)
C     SEGUNDO PASO
      S21=DT*SUS(PAR,S1,S2+S20/2.0,S3,K)
      T2S21=(S21/DT)*((K*DX)**2)
C     TERCER PASO
      S22=DT*SUS(PAR,S1,S2+S21/2.0,S3,K)
      T3S22=(S22/DT)*((K*DX)**2)
C     CUARTO PASO
      S23=DT*SUS(PAR,S1,S2+S22,S3,K)
      T4S23=(S23/DT)*((K*DX)**2)
C     ACTUALIZAR
      S(K)=S2+(1.0/6.0)*(S20+2.0*S21+2.0*S22+S23)
C     TERMINO DE ACUMULACION DE LACTOSA
      TAS(K)=(1.0/6.0)*(T1S20+2.0*T2S21+2.0*T3S22+T4S23)
C     TERMINO DE REACCION DE LACTOSA
```

```
      TRS(K)=RELACTO(PAR,S1,S(K),S3,K)
C     TERMINO DEL CICLO
  100 CONTINUE
C     PROCEDIMIENTO PARA ACTUALIZAR CONCENTRACIONES EN EL MEDIO LIQUIDO
C     METODO DE VALORES PROMEDIO
C     CON UN SOLO PASO EN EL TIEMPO
      TIEM=(KT*DT*R0*R0/DES)
C     PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE ACUMULACION DE LACTOSA
C     PARA BALANCE DE MASA
      SUM1=0
      DO 500 J=3,NK-3,+2
      SUM1=SUM1+TAS(J)
  500 CONTINUE
      SUM2=0
      DO 600 I=2,NK-2,+2
      SUM2=SUM2+TAS(I)
  600 CONTINUE
C     EVALUACION DE LA INTEGRAL DE ACUMULACION DE LACTOSA
      RINTAL=(1.0-0.0)*(TAS(1)+4.0*SUM1+2.0*SUM2+TAS(NK-1))/(3.0*(NK-1))
C     PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE REACCION DE LACTOSA
C     PARA BALANCE DE MASA
      SUM11=0
      DO 501 J=3,NK-3,+2
      SUM11=SUM11+TRS(J)
  501 CONTINUE
      SUM22=0
      DO 601 I=2,NK-2,+2
      SUM22=SUM22+TRS(I)
  601 CONTINUE
C     EVALUACION DE LA INTEGRAL DE REACCION DE LACTOSA
      RINTRL=(1.0-0.0)*(TRS(1)+4.0*SUM11+2.0*SUM22+TRS(NK-1))/
     *     (3.0*(NK-1))
C     PROCEDIMIENTOS DE ACTUALIZACION
C     PROCEDIMIENTO DE ACTUALIZACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA
      T11=3.0*VI*RINTAL/VL
      T22=3.0*VI*RINTRL/VL
      S(NK)=S(NK)+(FR*R0*R0*(1.0-S(NK))/(VL*DES))*DT+DT*(-T11-T22)
C     CONTEO DE TIEMPO
      KTC1=KT1-KR1
C     REGISTRO DE PERFILES EN LA ESFERULA AL ARCHIVO EXISTO.RES
      IF((KTC1.EQ.53140).OR.(KT1.EQ.KR1)) THEN
      KR1=KT1
      NC=NC+1
      WRITE(*,*)'NC,SNK',NC,S(NK),tiem
      F(NC)=S(NK)*37.17
      ELSE
      END IF
C     TERMINACION DE ACTUALIZACION EN EL MEDIO
C     REGRESAR A HACER OTRA ITERACCION EN EL TIEMPO
      IF(KT.EQ.NMAX) THEN
      GOTO 30
      ELSE
      END IF
      GOTO 20
C     TERMINACION DE LA SUBRUTINA PRINCIPAL
   30 RETURN
      END
C     FUNCION DEL CONSUMO DE LACTOSA DENTRO DE LA ESFERULA
      FUNCTION SUS(PAR,S1,S2,S3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/DX
      COMMON/CONIN/S0
      DIMENSION PAR(2)
C     PARAMETROS CINETICOS
C     MODULO DE THIELDE
      TH=PAR(1)
C     COSTANTE DE SATURACION
      RKS=PAR(2)
C     CARGA DE BIOMASA
      XB=7.0
```

```
C   MODELO
    T1=(S3-2.0*S2+S1)/(DX*DX)
    T2=2.0*(S3-S1)/(K*DX*DX)
    T3=TH*S2*XB/(RKS+S0*S2)
    SUS=T1+T2-T3
    RETURN
    END
C   FUNCION PARA EVALUAR EL TERMINO REACTIVO DE LA LACTOSA
    FUNCTION RELACTO(PAR,S1,S2,S3,K)
    IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
    COMMON/CONDI/DX
    COMMON/CONIN/S0
    DIMENSION PAR(2)
C   PARAMETROS CINETICOS
C   MODULO DE THIELDE
    TH=PAR(1)
C   CONSTANTE DE SATURACION
    RKS=PAR(2)
C   CARGA DE BIOMASA
    XB=7.0
    T1=TH*S2*XB/(RKS+S0*S2)
    T2=(K*DX)**2
    RELACTO=T1*T2
    RETURN
    END
```

Apéndice D-5
PROGRAMA TH.FOR

Este programa se construyó para hacer una estimación del factor efectividad en el problema de difusión y reacción. El factor de efectividad se calculó de acuerdo a la ecuación 3-54. Los términos de esta ecuación son evaluados a partir de la solución de la ecuación 3-49 en estado estable. Como método de solución se utilizaron diferencias finitas con discretización radial.

```
$DEBUG
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      DIMENSION F(1000,1000),C(1000),DC(1000)
      OPEN(1,FILE="gordi.RES")
C     DATOS DE ENTRADA
C     'CUAL ES EL PASO DE INTEGRACION'
      DX=0.01
C     'CUAL ES EL ERROR'
      ERROR=0.00001
C     WRITE(*,*)'CUAL ES LA CONCENTRACION DE ADIMENCIONAMIENTO'
C     READ(*,*)C0
      NK=1.0/DX
      WRITE(*,*)'CUAL ES LA CONCENTRACION EN LA SUPERFICIE'
      READ(*,*)C(NK)
C     PARAMETROS CINETICO
      WRITE(*,*)'MODULO DE THIELDE'
      READ(*,*)TH
C     'CONSTANTE DE SATURACION'
      RKS=7.731207
C     'CARGA DE BIOMASA'
      XB=7.0
      C0=37.17
C     ENTRADA DEL PERFIL INICIAL
      DO 10 I=2,NK-1
      C(I)=0.0
   10 CONTINUE
C     PROCEDIMIENTO PARA LLENADO DEL JACOBIANO
C     LLENADO DEL PRIMER RENGLON
   50 F(1,1)=-TH*XB*RKS/((RKS+C(1)*C0)**2)
      F(1,2)=-1.0/(DX*DX)
      F(1,3)=1.0/(DX*DX)
      F(1,NK)=-((C(3)-C(2))/(DX*DX)-TH*XB*C(1)/(RKS+C(1)*C0))
      DO 100 J=4,NK-1
      F(1,J)=0.0
  100 CONTINUE
C     LLENADO DEL ULTIMO RENGLON NK-1
      F(NK-1,NK-1)=-2.0/(DX*DX)-TH*XB*RKS/((RKS+C0*C(NK-1))**2)
      F(NK-1,NK-2)=1.0/(DX*DX)-1.0/((NK-1)*DX*DX)
      T1=1.0/(DX*DX)+1.0/((NK-1)*DX*DX)
      T2=2.0/(DX*DX)
      T3=1.0/(DX*DX)-1.0/((NK-1)*DX*DX)
      T4=TH*C(NK-1)*XB/(RKS+C0*C(NK-1))
      F(NK-1,NK)=-(T1*C(NK)-T2*C(NK-1)+T3*C(NK-2)-T4)
      DO 200 J=1,NK-3
      F(NK-1,J)=0.0
  200 CONTINUE
C     LLENADO DE LOS RENGLONES INTERMEDIOS
      DO 300 I=2,NK-2
      DO 400 J=1,NK
      IF(J.EQ.(I-1))THEN
      F(I,J)=1.0/(DX*DX)-1.0/(I*DX*DX)
      ELSE
      IF(J.EQ.I)THEN
```

```
      F(I,J)=-2.0/(DX*DX)-TH*XB*RKS/((RKS+C0*C(I))**2)
      ELSE
      IF(J.EQ.(I+1))THEN
      F(I,J)=1.0/(DX*DX)+1.0/(I*DX*DX)
      ELSE
      IF(J.EQ.(NK))THEN
      T5=1.0/(DX*DX)+1.0/(I*DX*DX)
      T6=2.0/(DX*DX)
      T7=1.0/(DX*DX)-1.0/(I*DX*DX)
      F(I,J)=-(T5*C(I+1)-T6*C(I)+T7*C(I-1)-TH*C(I)*XB/(RKS+C0*C(I)))
      ELSE
      F(I,J)=0.0
      END IF
      END IF
      END IF
      END IF
  400 CONTINUE
  300 CONTINUE
C     LLAMADA A LA SUBRUTINA PARA RESOLVER EL JACOBIANO
      CALL GAUS(F,NK,DC)
C     ACTUALIZACION DE LAS CONCENTRACIONES
      DO 120 K=1,NK-1
      C(K)=C(K)+DC(K)
  120 CONTINUE
C     VERIFICACION DE CONVERGENCIA
      RMIN=ABS(DC(1))
      DO 30 N=2,NK-1
      REF=ABS(DC(N))
      IF(REF.LT.RMIN)THEN
      RMIN=REF
      ELSE
      END IF
   30 CONTINUE
      IF(RMIN.LT.ERROR) THEN
      GO TO 40
      ELSE
      GO TO 50
C     HACER OTRA ITERACION
      END IF
   40 DO 125 I=1,NK
      WRITE(1,*)I,C(I)
  125 CONTINUE
      T1=3.0*(C(NK)-C(NK-1))/DX
      T2=TH*C(NK)*XB/(RKS+C0*C(NK))
      FE=T1/T2
      WRITE(*,*)'FACTOR DE EFECTIVIDAD',FE,C(NK),C(NK-1)
      CLOSE(1)
      STOP
      END
C     ||||||°°°°°°°SUBRUTINA PARA RESOLVER EL JACOBIANO °°°°°°°||||||
      SUBROUTINE GAUS(F,NK,DC)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      DIMENSION F(1000,1000),DC(1000)
      DO 100 I=1,NK-1
      PIVOT=F(I,I)
      DO 200 J=1,NK
      F(I,J)=F(I,J)/PIVOT
  200 CONTINUE
      DO 300 K=1,NK-1
      IF(K.EQ.I) THEN
      ELSE
      RMUL=F(K,I)
      DO 400 K1=1,NK
      F(K,K1)=F(K,K1)-F(I,K1)*RMUL
  400 CONTINUE
      END IF
  300 CONTINUE
  100 CONTINUE
      DO 500 I=1,NK-1
      DC(I)=F(I,NK)
```

```
500 CONTINUE
  RETURN
  END
```

Apéndice D-6
PROGRAMA FERSIM.FOR

```
C    ESTE PROGRAMA SE CONSTRUYO PARA SIMULAR LA FERMENTACIÓN
C    PROPIONICA CON CELULAS INMOVILIZADAS EN CONTINU0.
C    EN ESTE PROGRAMA SE UTILIZA EL METODO DE LINEAS PARA EVALUAR
C    LAS ECUACIONES DIFERENCIALES PARCIALES.
     IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,P-Z)
     COMMON/PARAME/PAR
     COMMON/CONDI/VI,VL,R0,DT,DX
     COMMON/CONIN/S0
     DIMENSION S(1000),P(1000)
     DIMENSION TAS(1000),TAP(1000)
     DIMENSION TRS(1000),TRP(1000)
     OPEN(1,FILE="PEXT.RES")
     OPEN(2,FILE="PINT.RES")
C    ENTRADA DE CONDICIONES DE OPERACION
     WRITE(*,*)'CUAL ES EL VOLUMEN TOTAL DEL REACTOR EN ML'
     READ(*,*)VT1
     VT=VT1/1.0D06
     WRITE(*,*)'CUAL ES EL VOLÚMEN DE MEDIO DE CULTIVO EN ML'
     READ(*,*)VL1
     VL=VL1/1.0D06
C    ENTRADA DE FLUJOS DE ALIMENTACION
     F1=0.0
     F2=2.0
     F3=1.0
     F1=F1*60.0/1D06
     F2=F2*60.0/1D06
     F3=F3*60.0/1D06
     WRITE(*,*)'CUAL ES EL VOLUMEN DE SOPORTE EN ML'
     READ(*,*)VI1
     VI=VI1/1.0D06
     WRITE(*,*)'CUAL ES EL RADIO DE LA ESFERULA EN MM'
     READ(*,*)R01
     R0=R01/1000.0
     WRITE(*,*)'CUAL ES EL INCREMENTO EN TIEMPO ADIMENCIONAL'
     READ(*,*)DT
     WRITE(*,*)'CUAL ES EL INCREMENTO EN LA DIRECCION RADIAL'
     READ(*,*)DX
     NK=1.0/DX
C    CUAL ES EL NUMERO MAXIMO DE ITERACIONES'
     NMAX=1704490
C    ENTRADA DE CONDICIONES INICIALES
     S0=50.0
     S(NK)=44.11/S0
     P(NK)=0.22/S0
C    PERFILES INICIALES
     DO 200 K=NK-1,1,-1
     S(K)=S(NK)
     P(K)=P(NK)
 200 CONTINUE
C    DIFUSIVIDAD DE LA LACTOSA
     DES=2.19d-06
C    METODO DE RUNGE-KUTTA PARA CUATRO ECUACIONES
C    CONTADOR DEL TIEMPO
     KR=1
     KR2=1
     KT=0
  20 KT=KT+1
     IF((KT.LT.479387).OR.(KT.EQ.479387))THEN
     F0=F1
     ELSE
     IF((KT.GT.479387).AND.(KT.LT.1118572))THEN
     F0=F2
     ELSE
     F0=F3
```

```
      END IF
      END IF
      DO 100 K=NK-1,1,-1
      IF(K.EQ.1) THEN
      S1=S(K+1)
      P1=P(K+1)
      S2=S(K+1)
      P2=P(K+1)
      S3=S(K+1)
      P3=P(K+1)
      ELSE
      S1=S(K-1)
      P1=P(K-1)
      S2=S(K)
      P2=P(K)
      S3=S(K+1)
      P3=P(K+1)
      END IF
C     PRIMER PASO
      S20=DT*SUS(S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      P20=DT*PROP(S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      T1S20=(S20/DT)*((K*DX)**2)
      T1P20=(P20/DT)*((K*DX)**2)
      T1A20=(A20/DT)*((K*DX)**2)
C     SEGUNDO PASO
      S21=DT*SUS(S1,S2+S20/2.0,S3,P1,P2+P20/2.0,P3,K)
      P21=DT*PROP(S1,S2+S20/2.0,S3,P1,P2+P20/2.0,P3,K)
      T2S21=(S21/DT)*((K*DX)**2)
      T2P21=(P21/DT)*((K*DX)**2)
C     TERCER PASO
      S22=DT*SUS(S1,S2+S21/2.0,S3,P1,P2+P21/2.0,P3,K)
      P22=DT*PROP(S1,S2+S21/2.0,S3,P1,P2+P21/2.0,P3,K)
      T3S22=(S22/DT)*((K*DX)**2)
      T3P22=(P22/DT)*((K*DX)**2)
C     CUARTO PASO
      S23=DT*SUS(S1,S2+S22,S3,P1,P2+P22,P3,K)
      P23=DT*PROP(S1,S2+S22,S3,P1,P2+P22,P3,K)
      T4S23=(S23/DT)*((K*DX)**2)
      T4P23=(P23/DT)*((K*DX)**2)
C     ACTUALIZAR
      S00=S2+(1.0/6.0)*(S20+2.0*S21+2.0*S22+S23)
      P00=P2+(1.0/6.0)*(P20+2.0*P21+2.0*P22+P23)
      S(K)=S00
      P(K)=P00
      TAS(K)=(1.0/6.0)*(T1S20+2.0*T2S21+2.0*T3S22+T4S23)
      TAP(K)=(1.0/6.0)*(T1P20+2.0*T2P21+2.0*T3P22+T4P23)
      TRS(K)=RELACTO(S1,S(K),S3,P1,P(K),P3,A1,A(K),A3,K)
      TRP(K)=REPROP(S1,S(K),S3,P1,P(K),P3,A1,A(K),A3,K)
C     TERMINO DEL CICLO DE EVALUACION RADIAL
  100 CONTINUE
C     PROCEDIMIENTO PARA ACTUALIZAR CONCENTRACIONES EN EL MEDIO LIQUIDO
C     CON UN SOLO PASO EN EL TIEMPO
      TIEM=KT*DT*R0*R0/DES
C     PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE ACUMULACION DE LACTOSA
C     PARA BALANCE DE MASA
      SUM1=0
      DO 500 J=3,NK-3,+2
      SUM1=SUM1+TAS(J)
  500 CONTINUE
      SUM2=0
      DO 600 I=2,NK-2,+2
      SUM2=SUM2+TAS(I)
  600 CONTINUE
C     EVALUACION DE LA INTEGRAL DE ACUMULACION DE LACTOSA
      RINTAL=(1.0-0.0)*(TAS(1)+4.0*SUM1+2.0*SUM2+TAS(NK-1))/(3.0*(NK-1))
C     PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE REACCION DE LACTOSA
C     PARA BALANCE DE MASA
      SUM11=0
      DO 501 J=3,NK-3,+2
      SUM11=SUM11+TRS(J)
```

```
501 CONTINUE
  SUM22=0
  DO 601 I=2,NK-2,+2
  SUM22=SUM22+TRS(I)
601 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE REACCION DE LACTOSA
  RINTRL=(1.0-0.0)*(TRS(1)+4.0*SUM11+2.0*SUM22+TRS(NK-1))/
  *     (3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE ACUMULACION DE PROPIONICO
C   PARA BALANCE DE MASA
   SUM33=0
   DO 502 J=3,NK-3,+2
   SUM33=SUM33+TAP(J)
502 CONTINUE
   SUM44=0
   DO 602 I=2,NK-2,+2
   SUM44=SUM44+TAP(I)
602 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE ACUMULACION DE PROPIONICO
   RINTAP=(1.0-0.0)*(TAP(1)+4.0*SUM33+2.0*SUM44+TAP(NK-1))/
   *     (3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA  INTEGRAL DE REACCION DE PROPIONICO
C   PARA BALANCE DE MASA
   SUM55=0
   DO 503 J=3,NK-3,+2
   SUM55=SUM55+TRP(J)
503 CONTINUE
   SUM66=0
   DO 603 I=2,NK-2,+2
   SUM66=SUM66+TRP(I)
603 CONTINUE
C   EVALUACION DE LA INTEGRAL DE REACCION DE PROPIONICO
   RINTRP=(1.0-0.0)*(TRP(1)+4.0*SUM55+2.0*SUM66+TRP(NK-1))/
   *     (3.0*(NK-1))
C   PROCEDIMIENTOS DE ACTUALIZACION
C   PROCEDIMIENTO DE ACTUALIZACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA
   T11=3.0*VI*RINTAL/VL
   T22=3.0*VI*RINTRL/VL
   S(NK)=S(NK)+(F0*R0*R0*(1.0-S(NK))/(VL*DES))*DT+DT*(-T11-T22)
C   PROCEDIMIENTO PARA ACTUALIZACION DE PROPIONICO
   T33=3.0*VI*RINTAP/VL
   T44=3.0*VI*RINTRP/VL
   P(NK)=P(NK)-(F0*R0*R0*P(NK)/(VL*DES))*DT+DT*(T44-T33)
C   CONTEO DE TIEMPO
   KTC=KT-KR
C   REGISTRO DE PERFILES EN EL MEDIO AL ARCHIVO PIENSO.RES
   IF((KTC.EQ.53265).OR.(KT.EQ.KR)) THEN
   KR=KT
   WRITE(1,*)'TIEMPO:',TIEM
   WRITE(1,*)TIEM,S(NK)*S0,P(NK)*S0,A(NK)*S0
   WRITE(*,*)'TIEMPO:',TIEM
   WRITE(*,*)TIEM,S(NK)*S0,P(NK)*S0,A(NK)*S0
   ELSE
   END IF
C   REGISTRO DE PERFILES EN LA ESFERULA AL ARCHIVO EXISTO.RES
   KTC1=KT-KR2
   IF((KTC1.EQ.132850).OR.(KT.EQ.KR2)) THEN
   KR2=KT
   WRITE(2,*)'TIEMPO:'.TIEM
   WRITE(2,*)'K','S','P','A'
   DO 300 I=NK,1,-1
   WRITE(2,*)I,S(I)*S0,P(I)*S0,A(I)*S0
300 CONTINUE
   ELSE
   END IF
C   TERMINACION DE ACTUALIZACION EN EL MEDIO
C   REGRESAR A HACER OTRA ITERACION EN EL TIEMPO
   IF(KT.EQ.NMAX) THEN
   GOTO 30
   ELSE
```

```
      END IF
      GOTO 20
C     TERMINACION DEL PROGRAMA PRINCIPAL
   30 CLOSE(1)
      CLOSE(2)
      STOP
      END
C     FUNCION DEL CONSUMO DE LACTOSA DENTRO DE LA ESFERULA
      FUNCTION SUS(S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/VI,VL,R0,DT,DX
      COMMON/CONIN/S0
      TH=0.7103
      RKS=7.6
      XB=7.0
C     MODELO
      T1=(S3-2.0*S2+S1)/(DX*DX)
      T2=2.0*(S3-S1)/(K*DX*DX)
      T3=TH*S2*XB/(RKS+S0*S2)
      SUS=T1+T2-T3
      RETURN
      END
C     FUNCION DE FORMACION DE PROPIONICO DENTRO DEL PELLET
      FUNCTION PROP(S1,S2,S3,P1,P2,P3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/VI,VL,R0,DT,DX
      COMMON/CONIN/S0
      TH=0.7103
      RKS=7.6
      XB=7.0
      RD=1.62
C     MODELO
      T1=(P3-2.0*P2+P1)/(DX*DX)
      T2=2.0*(P3-P1)/(K*DX*DX)
      YPS=0.3722
      T3=YPS*TH*S2*XB/(RKS+S0*S2)
      PROP=RD*(T1+T2)+T3
      RETURN
      END

C     FUNCION PARA EVALUAR EL TERMINO REACTIVO DE LA LACTOSA
      FUNCTION RELACTO(S1,S2,S3,P1,P2,P3,A1,A2,A3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/VI,VL,R0,DT,DX
      COMMON/CONIN/S0
      TH=0.7103
      RKS=7.6
      XB=7.0
C     MODELO
      T3=TH*S2*XB/(RKS+S0*S2)
      RELACTO=T3*((K*DX)**2)
      RETURN
      END
C     FUNCION PARA EVALUAR EL TERMINO REACTIVO DEL PROPIONICO
      FUNCTION REPROP(S1,S2,S3,P1,P2,P3,A1,A2,A3,K)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      COMMON/CONDI/VI,VL,R0,DT,DX
      COMMON/CONIN/S0
      TH=0.7103
      RKS=7.6
      XB=7.0
      YPS=0.3722
      T3=YPS*TH*S2*XB/(RKS+S0*S2)
      REPROP=T3*((K*DX)**2)
      RETURN
      END
```

APÉNDICE E
DATOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS.

Apéndice E-1
SISTEMA: CÉLULAS LIBRES (37°C, pH 6.5 y 6.0 g/l de extracto de levadura)

Datos de Lactosa (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo sin retraso	Cal. Modelo con retraso
0	53.50	53.50	53.50	53.50	53.50
5	50.90	52.60	51.75	51.60	52.04
10	50.00	51.80	50.90	48.46	48.99
15	44.50	45.70	45.10	43.66	43.66
20	35.50	32.80	34.15	37.04	36.25
25	26.00	26.25	26.07	28.94	27.73
30	17.80	19.90	18.65	20.28	19.16
35	13.81	10.50	12.15	12.39	11.50
40	8.92	7.66	8.29	6.50	5.68
45	4.92	4.83	4.87	3.01	2.25
50	1.44	1.05	1.24	1.31	0.77
55	1.18	1.01	1.09	0.57	0.26
60	0.15	0.88	0.51	0.26	0.09
65	0.15	0.22	0.18	0.12	0.03
70	0.16	0.22	1.19	0.06	0.01

Datos de Biomasa (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo sin retraso	Cal. Modelo con retraso
0	0.70	0.65	0.67	0.67	0.67
5	0.66	0.74	0.70	1.21	1.06
10	0.66	1.22	0.94	2.09	1.93
15	2.53	3.71	3.12	3.41	3.47
20	5.90	6.90	6.40	5.18	5.53
25	8.02	9.19	8.60	7.26	7.77
30	9.69	10.21	9.95	9.32	9.81
35	11.10	11.04	11.07	10.96	11.37
40	11.77	10.68	11.22	11.83	12.19
45	12.03	10.68	11.35	11.88	12.17
50	12.03	9.72	10.87	11.35	11.55
55	11.75	8.66	10.20	10.58	10.68
60	10.99	8.02	9.50	9.75	9.79
65	10.33	7.92	8.87	8.93	8.95
70	9.87	7.17	8.52	8.16	8.18

Datos de Ácido Propiónico (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo sin retraso	Cal. Modelo con retraso
0	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00
5	1.12	0.38	0.75	1.15	0.00
10	2.31	0.72	1.52	3.06	0.81
15	3.59	2.14	2.86	5.98	3.66
20	8.00	8.35	8.30	10.00	8.20
25	12.65	13.87	13.21	14.93	13.76
30	18.81	21.52	20.16	20.20	19.55
35	23.04	26.02	24.53	25.00	24.86
40	27.78	30.59	29.13	28.58	28.96
45	31.24	34.25	32.74	30.71	31.39
50	31.11	34.28	32.69	31.74	32.44
55	31.11	34.00	32.53	32.19	32.80
60	31.11	34.10	32.60	32.38	32.91
65	31.53	34.15	32.84	32.46	32.95
70	31.53	34.15	32.84	32.50	32.97

Datos de Ácido Acético (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo sin retraso	Cal. Modelo con retraso
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.90	-----	0.90	0.56	0.00
10	0.98	-----	0.98	1.51	0.66
15	1.53	-----	1.53	2.94	2.34
20	3.13	-----	3.13	4.93	4.93
25	10.71	8.75	9.73	7.36	8.01
30	11.90	12.54	12.22	9.96	11.13
35	13.37	13.66	13.50	12.33	13.90
40	14.57	15.47	15.02	14.09	15.94
45	17.45	-----	17.45	15.14	17.02
50	17.09	-----	17.09	15.65	17.35
55	16.04	18.18	17.09	15.87	17.35
60	16.04	17.42	16.86	15.97	17.26
65	17.06	-----	17.06	16.01	17.16
70	16.04	18.12	17.06	16.03	17.08

Apéndice E-2
DATOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS.
SISTEMA: CÉLULAS LIBRES (35°C, pH 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura)

Datos de Lactosa (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo con retraso
0	56.66	56.24	56.45	56.45
5	54.58	56.14	55.35	54.66
10	53.33	56.24	54.78	52.25
15	44.19	51.68	47.93	49.38
20	41.28	47.10	44.19	46.25
25	40.86	43.77	42.31	42.98
30	37.95	35.87	36.91	39.68
35	36.33	35.04	35.68	36.41
40	33.00	32.54	32.77	33.19
45	31.33	30.05	30.69	30.06
50	26.72	26.30	26.51	27.03
55	26.31	23.10	25.05	24.13
60	25.65	22.15	23.98	21.38

Datos de Biomasa (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo con retraso
0	0.62	0.52	0.57	0.57
5	0.47	0.36	0.41	0.80
10	0.79	0.57	0.68	1.13
15	1.35	0.95	1.15	1.53
20	2.39	1.70	2.04	1.96
25	3.23	2.31	2.87	2.42
30	3.65	2.76	3.21	2.88
35	3.34	2.95	3.14	3.33
40	3.81	3.39	3.60	3.78
45	5.88	4.49	4.94	4.21
50	5.50	4.18	4.84	4.63
55	5.62	4.37	4.70	5.03
60	5.48	4.48	5.01	5.39

Datos de Ácido Propiónico (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo con retraso
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.47
15	2.36	0.00	1.18	1.33
20	4.58	1.36	2.97	2.40
25	4.94	3.15	4.05	3.58
30	5.30	4.60	4.65	4.79
35	6.58	5.40	5.99	5.98
40	7.85	5.69	6.77	7.14
45	9.79	7.01	8.40	8.23
50	9.79	10.48	10.13	9.24
55	9.57	10.76	10.16	10.15
60	9.68	10.92	10.30	10.95

Datos de Ácido Acético (g/l):

Tiempo (h)	Exp. I	Exp. II	Promedio	Cal. Modelo con retraso
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.11
15	0.33	-----	0.33	0.35
20	0.95	0.70	0.83	0.65
25	1.28	0.98	1.13	0.98
30	1.30	------	1.30	1.32
35	1.67	------	1.67	1.65
40	1.89	------	1.89	1.98
45	2.66	2.04	2.35	2.28
50	3.03	2.63	2.83	2.57
55	2.83	-----	2.83	2.82
60	3.15	2.61	2.88	3.05

Apéndice E-3
DATOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS.
SISTEMA: CÉLULAS INMOVILIZADAS (35°C, pH 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura)
REACTOR TIPO TANQUE.

Datos de Lactosa (g/l):

Tiempo (h)	Experimentales (Herrera, 1997)	Modelo I (Con crecimiento)	Modelo II (Sin crecimiento)
4	37.17	37.17	37.17
8	34.81	35.38	34.83
12	32.82	33.36	32.51
16	31.43	31.15	30.21
20	28.81	28.79	27.96
24	26.75	26.36	25.74
28	22.96	23.91	23.57
32	20.52	21.52	21.44
36	19.41	19.23	19.37
40	16.73	17.10	17.37
44	15.02	15.17	15.43
48	13.30	13.44	13.57
52	11.86	11.93	11.80
56	9.81	10.63	10.13
60	9.36	9.54	8.57

Datos de A. Propiónico (g/l):

Tiempo (h)	Experimentales (Herrera, 1997)	Modelo I (Con crecimiento)	Modelo II (Sin crecimiento)
4	1.60	1.60	1.60
8	3.52	2.67	2.94
12	4.12	3.89	4.29
16	4.38	5.23	5.61
20	5.58	6.63	6.92
24	9.13	8.12	8.21
28	10.83	9.59	9.47
32	11.50	11.04	10.70
36	12.80	12.42	11.91
40	12.88	13.70	13.08
44	14.37	14.87	14.22
48	14.90	15.91	15.32
52	15.67	16.82	16.37
56	19.17	17.61	17.36
60	20.08	18.61	18.30

Apéndice E-3
DATOS EXPERIMENTALES Y CALCULADOS.
SISTEMA: CÉLULAS INMOVILIZADAS (35°C, pH 5.5 y 2.5 g/l de extracto de levadura)
REACTOR TUBULAR DE LECHO FLUIDIZADO.

Tabla de datos.

Tiempo (h)	Lactosa (g/l) Experimental	A. Propiónico (g/l) Experimental	Lactosa (g/l) Calculada	A. Propiónico (g/l) Calculada
0	44.11	0.22	44.11	0.22
4	43.69	1.09	41.91	1.02
8	39.49	1.37	39.72	1.82
12	35.71	1.75	37.56	2.61
16	34.45	2.79	35.42	3.39
20	33.61	4.42	33.30	4.17
24	29.83	4.62	31.21	4.94
28	29.41	5.93	29.14	5.69
32	27.73	7.21	27.10	6.44
36	26.05	7.06	25.10	7.17
40	28.00	7.43	28.50	6.33
44	30.70	6.47	31.14	5.68
48	31.57	5.49	33.21	5.18
52	33.77	4.23	34.83	4.79
56	35.96	4.30	36.09	4.48
60	38.50	3.91	37.09	4.24
64	40.00	3.87	37.86	4.06
68	39.13	4.34	38.47	3.92
72	39.13	4.09	38.95	3.80
76	40.00	4.11	39.32	3.72
80	39.13	3.85	39.61	3.65
84	40.43	4.46	39.84	3.59
88	39.13	5.53	38.92	3.94
92	38.09	4.71	38.10	4.25
96	36.90	4.25	37.38	4.53
100	35.70	4.50	36.75	4.77
104	34.52	4.95	36.19	4.98
108	34.87	5.70	35.70	5.17
112	34.61	6.46	35.27	5.33
116	34.57	6.60	34.89	5.48
120	34.10	6.66	34.55	5.61
124	34.28	6.72	34.26	5.72
128	34.54	5.86	34.00	5.82

Tabla de datos para el cálculo del error experimental:

Hora (h)	Lactosa I	Lactosa II	A. Propiónico I	A. Propiónico II
0	44.27	44.00	0.50	0.22
4	42.24	42.64	0.89	0.99
8	40.12	39.47	1.12	1.21
12	38.28	35.47	1.71	1.65
16	36.23	34.40	2.21	2.79
20	34.25	33.02	2.74	3.42
24	33.08	35.22	2.20	2.42
28	33.96	37.99	1.54	1.16
32	36.16	38.04	1.50	1.09
36	36.73	39.06	3.83	1.05
40	37.31	39.79	3.83	1.47
44	39.08	40.42	3.05	2.89
48	37.31	40.83	2.94	3.14