

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**MODELAMIENTO DE LA TRANSFERENCIA DE CALOR Y MASA (AGUA) EN UN  
BIORREACTOR DE CHAROLAS PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA MONTERO**

**INGENIERO BIOQUÍMICO INDUSTRIAL**

Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

Dr. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

Dr. SERGIO HUERTA OCHOA

DIRECTOR DE TESIS

ASESOR

ASESOR

**MAYO 2011**

---

**El doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana  
esta incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del  
CONACyT la referencia 001566**

---

---

México D.F. a 3 de Mayo de 2011.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
tesis

**MODELAMIENTO DE LA TRANSFERENCIA DE CALOR Y MASA (AGUA) EN UN  
BIORREACTOR DE CHAROLAS PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

que presentó  
*Arturo Alejandro Figueroa Montero*

Director: Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesor: Mariano Gutiérrez Rojas  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesor: Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**JURADO**

Presidente: Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Vocal: Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Vocal: Dr. Luciano Aguilera Vázquez  
Dirección de Estudios de Posgrado  
Dirección General de Educación Superior Tecnológica

The image shows four handwritten signatures in black ink, each placed over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to: 1. Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda (President), 2. Dr. Mariano Gutiérrez Rojas (Secretary), 3. Dr. Sergio Huerta Ochoa (Vocal), and 4. Dr. Luciano Aguilera Vázquez (Vocal). The signatures are stylized and cursive.

---

Agradecimientos y dedicatoria.

A Gloria Trejo por ser mi compañera de vida.

A Emilio y Julia por ser el impulso de mi vida, esto es para ustedes.

A Ma.Teresa Torres por su gran amistad y apoyo.

A mis padres, María Cristina Montero y Guillermo Luis Figueroa por creer en mi siempre.

A mis hermanos Karla Eugenia y Guillermo Luis por estar conmigo a pesar de la distancia.

Al Dr. Ernesto Favela por la paciencia que me tuvo y el tiempo dedicado a este trabajo.

Al Dr. Gerardo Saucedo por su guía y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

A los Drs. Mariano Gutiérrez y Sergio Huerta por sus observaciones y sugerencias.

Al Dr. Luciano Aguilera por la revisión de este documento.

Al M en C Tristán Esparza por la asesoría.

A todos los doctores, mis amigos y compañeros de la UAM-I y a todos los integrantes de la Planta Piloto 4 por dejarme conocerlos y convivir con ustedes durante todo este tiempo y sobre todo por brindarme su amistad, apoyo y enseñarme cosas nuevas.

Muy en especial a los que compartieron mucho de su tiempo conmigo  
Isaías Nava, José Novoa, Cristóbal Aguilar, Antonio Aguilera, Oscar Nuñez, Israel Gerardo y  
Uriel Ángel.

Dedicada a la memoria de Octavio, Gladys, Christopher y Domingo.

Dedicada a Emilio y Julia.

Gracias a todos.

---

**RESUMEN**

En este trabajo se construyó un modelo matemático para la predicción de los perfiles de temperatura y contenido de humedad en el lecho de un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido (FMS). Para este propósito se desarrollaron balances de calor y masa (agua) que consideraron los principales mecanismos de transferencia de calor y masa en el lecho de fermentación. Estos balances fueron empleados para estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua). También se propusieron biorreacciones de consumo de sustrato y generación de biomasa, CO<sub>2</sub> y agua, se llevaron a cabo los balances estequiométricos para describir el crecimiento de los microorganismos.

Se emplearon dos cepas, *Aspergillus niger* AT para las fermentaciones (corridas) en soporte-sustrato (70% salvado de trigo, 30% harina de soya) y *Aspergillus niger* C28B25 para las fermentaciones en soporte inerte (agrolita). En las corridas en soporte-sustrato se midió en línea la producción de CO<sub>2</sub> y la temperatura (sin almacenamiento de datos) y fuera de línea los valores iniciales y finales del contenido de humedad de lecho de fermentación, actividad de agua, pH y actividad enzimática de la fitasa. En las corridas en soporte inerte, se midió en línea la producción de CO<sub>2</sub> y la temperatura (ambas con almacenamiento de datos), y fuera de línea y a intervalos regulares de tiempo la humedad, la actividad de agua, pH, actividad enzimática de la invertasa, concentración de biomasa producida, concentración de sustrato consumido. La medición en línea del CO<sub>2</sub> resultó importante en el proceso ya que a partir de estos datos se estimó la generación de agua metabólica, producción de biomasa y generación de calor metabólico empleando las biorreacciones propuestas.

Las ecuaciones diferenciales ordinarias obtenidas de los balances de agua y energía permitieron realizar la predicción de los perfiles de temperatura y del contenido de humedad del lecho en el biorreactor de charolas. El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias fue resuelto usando el algoritmo “Runge-Kutta.Fehlberg (RKF56) del software Polymath<sup>®</sup> Versión 6.0. Los balances integrales de materia y energía permitieron estimar los coeficientes

de transferencia de calor y masa (agua) durante el crecimiento del microorganismo, los cuales fueron usados posteriormente en el modelo matemático propuesto.

Las predicciones de los perfiles de temperatura y humedad en el lecho de fermentación realizadas con el modelo, en comparación con los datos experimentales, mostraron buen ajuste para diferentes condiciones de operación en el biorreactor de charolas.

Como estrategia para la remoción del calor metabólico del lecho de fermentación se propuso el empleo de un sistema de ventiladores, para cambiar las condiciones de flujo del aire en el “headspace” (nombre con que se designa al espacio de aire dentro del biorreactor que no está dentro de la matriz del sustrato) del biorreactor, las variaciones provocadas por la circulación interna forzada del aire fueron definidas por medio del número de Reynolds ( $N_{Re}$ ). Se evaluó el efecto del  $N_{Re}$  y la altura del lecho de fermentación (variables de operación) sobre las variables medidas mencionadas anteriormente. Lo anterior se realizó para los estudios tanto en soporte-sustrato como en soporte inerte.

En los estudios con soporte-sustrato y con soporte inerte se observó que el aumento en la altura del lecho provoca mayor acumulación de calor en el lecho de fermentación que afectó negativamente las actividades enzimáticas.

El aumento en el  $N_{Re}$  tuvo un efecto positivo en la remoción de calor, mejorando las actividades enzimáticas, sin embargo, debe encontrarse un valor óptimo, ya que emplear altos valores del  $N_{Re}$  ocasiona secado del lecho de fermentación afectando negativamente la actividad enzimática.

**ABSTRACT**

In this paper we developed a mathematical model for predicting temperature and moisture content profiles in the bed of a tray bioreactor for solid-state fermentation (SSF). For this purpose we developed heat and mass (water) balances which considered the main mechanisms of heat and mass transfer in the fermentation bed. These balances were used to estimate the heat and mass (water) transfer coefficients. Bioreaction was also proposed for substrate consumption, biomass generation, CO<sub>2</sub> and water. Stoichiometric balances were carried out to describe the growth of microorganisms.

We used two strains, *Aspergillus niger* AT for fermentations (runs) on substrate-support (70%, wheat bran; 30%, soybean meal) and *Aspergillus niger* C28B25 for fermentations on inert support (perlite). In the runs on substrate-support, CO<sub>2</sub> production and fermentation bed temperature (no data storage) were on-line measured and initial and final moisture content of fermentation bed, water activity, pH and enzyme activity phytase were off-line measured. In the runs on inert support, CO<sub>2</sub> production and fermentation bed temperature (both data storage), were measured and at regular time intervals, moisture, water activity, pH, enzymatic activity of invertase, biomass concentration, substrate concentration were off-line measured. The online measurement of CO<sub>2</sub> production in the process was important because from these data, we estimated metabolic water generation, biomass and metabolic heat generation using the proposed bioreactions.

Ordinary differential equations obtained from the water and energy balances allowed predictions of temperature and moisture content profiles in the fermentation bed of tray bioreactor. The system of ordinary differential equations was solved using the algorithm "Runge-Kutta.Fehlberg (RKF56) Polymath ® software version 6.0. Integral mass and energy balances made possible to estimate the coefficients of heat and mass transfer (water) during the growth of microorganisms, which were used later in the mathematical model proposed.

The profiles predictions obtained with the model for temperature and moisture content in fermentation bed, showed good fit compared with the experimental data for different operating conditions in the tray bioreactor.

As a strategy for removing metabolic heat from the bed of fermentation the use of a fan system is proposed to change the air flow conditions in the bioreactor headspace (air space within the bioreactor that is not within the matrix of the substrate), the variations caused by internal forced air circulation were defined by the Reynolds number ( $N_{Re}$ ). The effect of the  $N_{Re}$  and fermentation bed height (operation variables) on the variables described above were evaluated. This study was conducted in both support-substrate as inert support.

In the studies with substrate support and inert support carried out was found that the increase in bed height leads to higher accumulation of heat in the fermentation bed affecting negatively to the enzyme activities.

The increase in the  $N_{Re}$  had a positive effect in heat removal, improving the enzyme activities, however, must be found an optimum value, since the use of high values of  $N_{Re}$  causes drying of fermentation bed that affect adversely the enzyme activities.



---

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	3
2.1 Fermentación en medio sólido	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Ventajas y desventajas de la FMS	4
2.1.3 Consideraciones para la FMS	6
2.2 Parámetros ambientales de la FMS	7
2.2.1 Contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ )	7
2.2.1.1 Relaciones del agua con el crecimiento microbiano	9
2.2.1.2 Relaciones del agua con la formación de producto	9
2.2.1.3 Factores que afectan el cambio de $a_w$ en procesos de FMS	10
2.2.1.4 Medición y control de $a_w$ en procesos de FMS	11
2.2.2 Temperatura y transferencia de calor	12
2.2.2.1 Generación de calor metabólico	12
2.2.2.2 Transferencia de calor y control de temperatura	13
2.2.2.3 Rangos de temperatura para el crecimiento y formación de producto	15
2.2.3 Transferencia de masa	15
2.2.3.1 Aireación	16
2.2.4 Concentración de sustrato y disponibilidad	17
2.2.5 Concentración de producto y rendimiento	18
2.2.6 pH	19
2.2.6.1 Factores que ocasionan cambios en el pH	19
2.2.6.2 Rangos de pH para el crecimiento microbiano	20
2.2.6.3 Control de pH	20
2.3 Principios generales en el diseño y operación de biorreactores para FMS	21
2.3.1 Criterios de selección	21
2.3.2 Consideraciones que afectan el diseño y la operación	22
2.3.2.1 Agitación	23
2.3.2.2 Aireación	25
2.3.2.3 Remoción de calor	26

---

2.3.2.4 Medición y control de parámetros de proceso	27
2.3.2.5 Modos de operación del biorreactor y clasificación de los procesos de FMS	28
2.4 Biorreactores para FMS	29
2.4.1 Biorreactores de charola	29
2.4.2 Biorreactores de lecho empacado	30
2.4.3 Biorreactores de tambor rotatorio	31
2.4.4 Biorreactores agitados	32
2.4.5 Biorreactores de lecho fluidizado aire-sólido	32
2.5 Balances de materia y energía en biorreactores para FMS	33
2.5.1 Balances de calor	34
2.5.2 Balances de agua	37
2.6 Modelamiento en sistemas biológicos	38
2.6.1 El modelo matemático	39
2.6.2 Clasificación de los modelos	40
2.6.3 Formulación de un modelo para FMS	41
2.7 Estado del arte del modelamiento de los balances de masa y energía en biorreactores de charola	42
2.7.1 Balances de calor para biorreactores de charola	42
2.7.2 Balances de agua para biorreactores de charola	45
2.7.3 Ideas clave obtenidas a partir de los modelos para biorreactores de charola y necesidades de innovación futura	45
2.7.4 Estrategias para la remoción de calor en biorreactores de charola	46
2.8 Soportes empleados en FMS	47
2.8.1 Residuos agro-industriales como soporte-sustrato	49
2.8.2 Soportes inertes	50
2.9. <i>Aspergillus niger</i>	51
2.9.1 Factores que influyen sobre el crecimiento y metabolismo de <i>A. niger</i>	52
2.9.2 Productos industriales del género <i>Aspergillus</i>	53
2.10 Producción de fitasa por FMS	54
2.10.1 Ácido fítico	54
2.10.2 Fitasa	55
2.11 Producción de invertasa por FMS	56

---

---

2.11.1 Invertasa	57
3. Justificación	58
4. Objetivos	60
4.1 Objetivo general	60
4.2 Objetivos particulares	60
5. Materiales, métodos y equipo empleado	62
5.1 Microorganismos	64
5.1.1 Microorganismo usado en los estudios con soporte-sustrato	64
5.1.1.1 Conservación y propagación de la cepa	64
5.1.1.2 Preparación de medio de inóculo	67
5.1.1.3 Preparación del pre-inóculo	67
5.1.1.4 Preparación del inóculo	67
5.1.2 Microorganismo usado en los estudios con soporte inerte	68
5.1.2.1 Conservación y propagación de la cepa	68
5.1.2.2 Preparación del inóculo	68
5.2 Sustratos y medios de fermentación	68
5.2.1 Medio de fermentación en los estudios con soporte-sustrato	69
5.2.1.1 Preparación del medio de fermentación	69
5.2.1.2 Formula mínima para el sustrato-soporte en la FMS	69
5.2.1.3 Composición en fracción másica del medio de FMS	70
5.2.2 Medio de fermentación en los estudios con soporte inerte	71
5.2.2.1 Medio de fermentación	71
5.2.2.2 Soporte inerte	73
5.3 Disposición del medio de fermentación	73
5.3.1 Charolas	73
5.3.2 Matraces	73
5.4 Medición de variables de la FMS	74
5.4.1 Temperatura	74
5.4.2 Registro en línea de CO <sub>2</sub>	74
5.4.3 Contenido de humedad del lecho de fermentación	75
5.4.4 pH de las muestras	76
5.4.5 Actividad de agua	76

---

5.4.6 Pérdida de materia seca	77
5.4.7 Densidad aparente del lecho de fermentación	78
5.4.8 Flujo de aire	79
5.4.9 Velocidad del aire	79
5.4.10 Número de Reynolds ( $N_{Re}$ )	79
5.4.11 Humedad del aire	80
5.5 Métodos analíticos	80
5.5.1 Determinación de la concentración de biomasa	80
5.5.2 Análisis de los azúcares	81
5.5.3 Actividades enzimáticas	81
5.5.3.1 Actividad enzimática de fitasa	81
5.5.3.2 Actividad enzimática de invertasa	84
5.6 Estimación de las propiedades físicas y termodinámicas de los medios de fermentación	85
5.6.1 Densidad real o de sólido	86
5.6.2 Conductividad térmica del sustrato sólido	86
5.6.3 Conductividad térmica del lecho de fermentación	87
5.6.4 Capacidad calorífica	88
5.6.5 Propiedades físicas y termodinámicas de los lechos de fermentación	89
5.7 Equipo para la FMS	89
5.7.1 Charolas	89
5.7.2 Biorreactor de charolas	90
5.7.3 Sistemas para la circulación interna forzada de aire	93
6. Resultados y discusiones	95
6.1 Balances de materia y energía	95
6.1.1 Balance estequiométrico	98
6.1.2 Balance de agua	100
6.1.3 Balance de energía	102
6.2 Estudios en soporte-sustrato	107
6.2.1 Balance estequiométrico	108
6.2.2 Estimación de los coeficientes de transferencia de masa y calor	109
6.2.3 Efecto de las variables de operación	110
6.2.3.1 Efecto de la altura del lecho de fermentación	110

---

---

6.2.3.2 Efecto de la circulación interna de aire por convección	122
6.2.4 Validación del modelo	128
6.2.5 Conclusiones parciales del estudio en soporte-sustrato	136
6.3 Estudios en soporte inerte	137
6.3.1 Balance estequiométrico	138
6.3.2 Estimación de los coeficientes de rendimiento	138
6.3.3 Estimación de los coeficientes de transferencia de masa	139
6.3.4 Estimación de los coeficientes de transferencia de calor	141
6.3.5 Efecto de las variables de operación	142
6.3.5.1 Efecto de la altura del lecho de fermentación	143
6.3.5.2 Efecto de la circulación interna de aire por convección	150
6.3.6 Validación del modelo	159
6.3.7 Conclusiones parciales del estudio en soporte inerte	162
7. Discusión general	164
8. Conclusiones	168
9. Referencias	170
Anexo	185

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 5.1.</b> Composición del medio de inóculo.	67
<b>Tabla 5.2</b> Composición de los componentes del medio de fermentación con soporte-sustrato.	70
<b>Tabla 5.3</b> Composición del medio de fermentación.	70
<b>Tabla 5.4</b> Composición del medio Pontecorvo modificado.	71
<b>Tabla 5.5</b> Elementos traza.	72
<b>Tabla 5.6</b> Composición del medio de fermentación.	72
<b>Tabla 5.7</b> Propiedades termodinámicas del los lechos de fermentación.	89
<b>Tabla 6.1.</b> Notación, unidades y valores de los parámetros utilizados en los balances y el modelo.	97
<b>Tabla 6.2</b> Condiciones de operación de FMS con salvado de trigo.	107
<b>Tabla 6.3</b> Coeficientes de rendimiento obtenidos a partir de los balances elementales (C, H, O y N) de la ecuación de reacción para el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> AT.	109
<b>Tabla 6.4</b> Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.	111
<b>Tabla 6.5</b> Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.	116
<b>Tabla 6.6</b> Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.	122
<b>Tabla 6.7</b> Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.	128
<b>Tabla 6.8</b> Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.	128
<b>Tabla 6.9</b> Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.	129
<b>Tabla 6.10</b> Condiciones de operación de FMS con soporte inerte.	137
<b>Tabla 6.11</b> Coeficientes de rendimiento estimados obtenidos a partir de los balances estequiométricos (Ec. 2).	139
<b>Tabla 6.12</b> Balance de agua y coeficientes de transferencia de masa estimados.	140
<b>Tabla 6.13</b> Balances de energía y coeficientes de transferencia de calor estimados.	142
<b>Tabla 6.14</b> Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.	143
<b>Tabla 6.15</b> Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.	151
<b>Tabla 6.16</b> Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.	159

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 2.1.</b> Visión esquemática de las cuatro contribuciones en el balance de agua durante la FMS de granos de trigo.	38
<b>Figura 2.2.</b> Los fenómenos de transferencia de calor y masa presentes en charolas con fondo sin perforaciones, sin tapa.	43
<b>Figura 5.1</b> Diagrama de flujo con el procedimiento general seguido en la realización de los experimentos con soporte-sustrato (salvado de trigo y harina de soya).	65
<b>Figura 5.2.</b> Diagrama de flujo con el procedimiento general seguido en la realización de los experimentos con soporte inerte (agrolita).	66
<b>Figura 5.3.</b> Biorreactor de charolas.	91
<b>Figura 5.4</b> Sistema de monitoreo de fermentación en biorreactor de charolas.	92
<b>Figura 5.5</b> Sistemas de ventilación.	94
<b>Figura 6.1</b> Diagrama esquemático de las relaciones entre los balances propuestos.	96
<b>Figura 6.2</b> Pérdida de materia seca vs CO <sub>2</sub> total en los estudios con soporte-sustrato.	102
<b>Figura 6.3</b> Diagrama esquemático de mecanismos de transferencia de calor en la charola de fermentación.	102
<b>Figura 6.4</b> Diagrama esquemático de los balances usados en la estimación del coeficiente global de transferencia de calor ( $U_t$ ) y del coeficiente de transferencia de masa ( $k_m$ ).	106
<b>Figura 6.5</b> Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas 1, 2 y 3.	112
<b>Figura 6.6</b> Contenido de humedad inicial y final en el lecho de fermentación para las corridas 1, 2 y 3.	113
<b>Figura 6.7</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> de las corridas 1, 2 y 3.	113
<b>Figura 6.8</b> Perfiles de producción de CO <sub>2</sub> para las corridas 1, 2 y 3.	114
<b>Figura 6.9</b> pH inicial y final para las corridas 1, 2 y 3.	115
<b>Figura 6.10</b> Actividad de agua inicial y final para las corridas 1, 2 y 3.	115
<b>Figura 6.11</b> Actividad enzimática relativa de la fitasa para las corridas 1, 2 y 3.	116
<b>Figura 6.12</b> Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas 5 y 6.	117
<b>Figura 6.13</b> Contenido de humedad inicial y final en el lecho de fermentación para las corridas 5 y 6.	118
<b>Figura 6.14</b> Tasas de producción de CO <sub>2</sub> de las corridas 5 y 6.	119
<b>Figura 6.15</b> Perfiles de producción de CO <sub>2</sub> para las corridas 5 y 6.	119

---

<b>Figura 6.16</b> pH inicial y final para las corridas 5 y 6.	120
<b>Figura 6.17</b> Actividad de agua inicial y final para las corridas 5 y 6.	121
<b>Figura 6.18</b> Actividad enzimática relativa de la fitasa para las corridas 5 y 6.	121
<b>Figura 6.19</b> Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas 4, 5 y 7.	123
<b>Figura 6.20</b> Contenido de humedad inicial y final en el lecho de fermentación para las corridas 4, 5 y 7.	124
<b>Figura 6.21</b> Tasas de producción de CO <sub>2</sub> para las corridas 4, 5 y 7.	125
<b>Figura 6.22</b> Perfiles de CO <sub>2</sub> para las corridas 4, 5 y 7.	125
<b>Figura 6.23</b> pH inicial y final para las corridas 4, 5 y 7.	126
<b>Figura 6.24</b> Actividad de agua inicial y final para las corridas 4, 5 y 7.	127
<b>Figura 6.25</b> Actividad enzimática relativa de la fitasa para las corridas 4, 5 y 7.	127
<b>Figura 6.26.</b> Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predicho de temperatura (línea continua gruesa). Para las corridas 1, 2 y 3.	130
<b>Figura 6.27</b> Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas).	131
<b>Figura 6.28</b> Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos de temperatura (línea continua gruesa). Para las corridas 5 y 6.	132
<b>Figura 6.29</b> Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas).	133
<b>Figura 6.30</b> Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos (línea continua gruesa). Para las corridas 4, 5 y 7.	134
<b>Figura 6.31</b> Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas).	133
<b>Figura 6.32</b> Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas A y B.	144
<b>Figura 6.33</b> Contenido de humedad promedio del lecho de fermentación para las corridas A y B.	145
<b>Figura 6.34</b> Tasas de producción de CO <sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.	146
<b>Figura 6.35</b> Producción de CO <sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación para las corridas A	146

---



---

y B.	
<b>Figura 6.36</b> Producción de biomasa bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.	147
<b>Figura 6.37</b> Consumo de sustrato bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.	148
<b>Figura 6.38</b> Perfiles de pH bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.	149
<b>Figura 6.39</b> Perfiles de $a_w$ bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.	149
<b>Figura 6.40</b> Actividad enzimática de la invertasa para las corridas A y B.	150
<b>Figura 6.41</b> Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas B y C.	152
<b>Figura 6.42</b> Contenido de humedad promedio del lecho de fermentación para las corridas B y C.	153
<b>Figura 6.43</b> Tasas de producción de CO <sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.	154
<b>Figura 6.44</b> Producción de CO <sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación para las corridas B y C.	154
<b>Figura 6.45</b> Producción de biomasa bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.	155
<b>Figura 6.46</b> Consumo de sustrato bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.	156
<b>Figura 6.47</b> Perfiles de pH bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.	157
<b>Figura 6.48</b> Perfiles de $a_w$ bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.	157
<b>Figura 6.49</b> Perfiles de actividad enzimática (invertasa) bajo diferentes condiciones de operación para las corridas B y C.	158
<b>Figura 6.50</b> Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos de temperatura (línea continua gruesa). Para las corridas A, B y C.	160
<b>Figura 6.51</b> Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas). Para las corridas A, B y C.	161

---

**ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

$a_w$	Actividad de agua	$\rho_{ap}$	Densidad aparente
$W_{Alim}$	Agua añadida al sistema	$\rho_{fi}$	Densidad de la fibra
$W_{cons}$	Agua consumida	$\rho_f$	Densidad de la grasa
$W_{Evap}$	Agua evaporada	$\rho_p$	Densidad de la proteína
$W_{Gen}$	Agua generada	$\rho_a$	Densidad de las cenizas
$A$	Área de la base de a charola	$\rho_c$	Densidad de los carbohidratos
$A_t$	Área transversal	$\rho_w$	Densidad del agua
PDA	Agar papa dextrosa	$\rho$	Densidad del aire dentro del biorreactor
$\lambda$	Calor latente de vaporización	$\rho_a$	Densidad del empaque aparente
$\Delta W$	Cambio en el contenido de agua	$\rho_s$	Densidad del lecho
$Cp_s$	Capacidad calórica del lecho	$\rho_b$	Densidad del lecho de fermentación
$Cp_b$	Capacidad calorífica del medio de fermentación	$\rho_i$	Densidad individual
$C_w$	Concentración del agua líquida	$\rho_{bs}$	Densidad real
$C_{VAP}$	Concentración de vapor de agua	FML	Fermentación en medio líquido
$D^*_{VAP}$	Coefficiente efectivo de difusión de vapor	FMS	Fermentación en medio sólido
$U$	Coefficiente global de transferencia de calor	$X_i$	Fracción másica
$k$	Conductividad	$X_b$	Fracción másica del sustrato
$k_{ap}$	Conductividad aparente	$m_f$	Fracción másica de la grasa
$k_{fi}$	Conductividad de la fibra	$m_p$	Fracción másica de la proteína
$k_f$	Conductividad de la grasa	$m_a$	Fracción másica de las cenizas
$k_p$	Conductividad de la proteína	$m_c$	Fracción másica de los carbohidratos
$k_a$	Conductividad de las cenizas	$m_w$	Fracción másica del agua
$k_c$	Conductividad de los carbohidratos	$X_{vi}$	Fracción volumétrica de cada componente
$k_w$	Conductividad del agua	$X_{va}$	Fracción volumétrica de espacio vacío
$k_i$	Conductividad pura del componente	$X_{va}$	Fracción volumétrica de aire
$k_b$	Conductividad térmica del lecho	$X_{vb}$	Fracción volumétrica del sustrato
$\beta$	Constante de proporcionalidad	$G$	Flujo de aire seco
$i$	Entalpia del aire húmedo	%H	Humedad
$H$	Entalpia del lecho	$H_R$	Humedad relativa
$L$	Espesor del lecho	L	Longitud de la charola

---

$m$	Masa de medio de fermentación	$Q_{acc}$	Tasa de acumulación de calor
$MTI$	Masa del medio de fermentación total inicial	$Q_{sen}$	Tasa de ganancia de entalpía
$MTF$	Masa del medio de fermentación total final	$Q_{met}$	Tasa de calor metabólico
$MHF$	Masa final de medio de fermentación húmedo	$Q_{metT}$	Tasa de calor metabólico total
$m_{CO_2}$	Masa total de $CO_2$	$Q_{evap}$	Tasa de pérdida de calor por evaporación
$MSI$	Materia seca inicial	$Q_{exch}$	Tasa de transferencia de calor
$MSF$	Materia seca final	$r_{H_2O}$	Tasa metabólica de producción de agua
$N_{Re}$	Número de Reynolds	$T_c$	Temperatura del fluido de enfriamiento
$\Delta T/\Delta t$	Pendiente de la curva temperatura vs tiempo	$T$	Temperatura del lecho
$PMS$	Pérdida de materia seca	$T_b$	Temperatura del lecho de fermentación
$Mch$	Peso de la charola	$U$	Unidad de actividad enzimática
$MH$	Peso de la muestra húmeda	$dW/dt$	Variación del contenido de agua del medio respecto al tiempo
$MS$	Peso de la muestra seca	$v_{aire}$	Velocidad del aire
$SI$	Soporte inerte	$\mu$	Viscosidad del aire dentro del biorreactor
$rpm$	Revoluciones por minuto	$VHF$	Volumen final de medio de fermentación húmedo

---

## 1 INTRODUCCIÓN

La fermentación en medio sólido (FMS) es definida como el crecimiento de microorganismos en sustratos húmedos, no solubles y con bajo contenido de agua (Cannel y Moo-Young, 1980). La FMS es empleada en la producción de enzimas (Pandey y col., 1999), bio-pesticidas (Vrije y col., 2001), productos comestibles y una amplia variedad de metabolitos secundarios (Robinson y col., 2001; Pandey y col., 2001). La generación de calor metabólico así como la baja conductividad térmica de los sustratos empleados en FMS, provocan el aumento en la temperatura del lecho de fermentación, afectando el metabolismo microbiano global (Saucedo-Castañeda y col., 1990). Debido a estas circunstancias, el escalamiento de los procesos de FMS desde el nivel laboratorio al nivel industrial requiere estudios detallados de los balances de energía y masa (agua), a fin de determinar apropiadamente los criterios de escalamiento (Saucedo-Castañeda y col., 1992).

Los biorreactores de FMS involucran dos modos de operación: estáticos (de charolas y lecho empacado o columna) y agitados (horizontal, vertical y tambor rotatorio). La transferencia de calor y masa ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y agua) ha sido ampliamente estudiada en biorreactores de lecho empacado y agitados (Mitchell y col., 2003). Sin embargo, aunque los biorreactores de charola han sido empleados desde hace mucho tiempo y que son considerados el tipo de biorreactor de FMS más simple (Pandey y col., 2001; Durand, 2003; Mitchell y col., 1992), se han publicado pocos estudios relacionados con la transferencia de calor y masa en éste tipo de biorreactores (Szewczyk, 1993; Rajagopalan y Modak, 1994 y 1995; Smits y col., 1999; Khanahmadi y col., 2004).

Aunque el lecho de fermentación en un biorreactor de charolas es un lecho empacado, la principal diferencia entre un biorreactor de lecho empacado y uno de charolas, es que en el primero la aireación pasa forzada a través del lecho mientras que en el último, la aireación es por arriba y por abajo del lecho. Esta diferencia hace que el análisis de la transferencia de calor y masa para reactores de charolas sea más complejo que para biorreactores de lecho empacado. Se han diseñado pocas estrategias para la remoción del calor metabólico durante la

fermentación de los lechos de este tipo de biorreactor. Se ha investigado la aplicación de superficies de enfriamiento (Khanahmadi, y col., 2004) y el desarrollo de un modelo matemático para el estudio de la transferencia de calor y masa. El uso de superficies de enfriamiento requiere la construcción de un nuevo biorreactor para el proceso de FMS. También se ha estudiado, el efecto de cambios dinámicos de aire sobre la transferencia de calor (Chen y col., 2002 y 2005; Xu y col., 2002); sin embargo, poco se ha trabajado en los balances de agua y de calor. Hasta el momento no ha recibido atención el efecto del número de Reynolds ( $N_{Re}$ ), como función del flujo de aire interno en el “headspace” (nombre con que se designa al espacio de aire dentro del biorreactor que no está dentro de la matriz del sustrato) de los biorreactores de charola, sobre la transferencia de calor y masa (Mitchell y col., 2003). Uno de los principales retos en FMS, continúa siendo la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa desde el lecho de fermentación hacia el aire en el “headspace” del biorreactor. Estos coeficientes de transferencia son parte fundamental de los modelos matemáticos. En algunos trabajos, los coeficientes de transferencia de calor son tomados de aquellos desarrollados para operaciones de secado con aire, pero éstos tienen sensibles diferencias con los procesos de FMS (Khanahmadi y col., 2004). En nuestro conocimiento, no están disponibles reportes científicos que presenten estudios que conduzcan a la estimación de coeficientes de transferencia de calor y masa en procesos de FMS. El uso de soportes inertes y medios definidos permite la medición del consumo del sustrato y producción de biomasa (Ooijkaas y col., 2000). Por lo tanto, los soportes inertes han sido usados como sistemas modelo a fin de desarrollar modelos matemáticos (Gutiérrez-Rojas y col., 1995 y 1996) que describan el proceso de FMS.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar balances integrales tanto de masa (agua) como de energía para estimar los coeficientes de transferencia de calor y estudiar el efecto de variables de operación como: altura del lecho de fermentación y circulación interna de aire bajo condiciones de convección natural y forzada, sobre la temperatura y contenido de agua del lecho de fermentación. Los balances de masa (agua) y energía fueron usados, a su vez, para desarrollar un modelo matemático que permitió predecir los perfiles de temperatura y contenido de humedad durante la fermentación.

## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fermentación en medio sólido**

La fermentación en medio sólido (FMS) emerge como una tecnología potencial para la producción de productos microbianos tales como alimento, combustible, químicos industriales y productos farmacéuticos. Su aplicación en bioprocesos como biolixiviación, bioremediación y la bioproducción de pasta para papel, entre otros brinda nuevas ventajas. El uso de residuos agro-industriales como sustratos en procesos de FMS ofrece una vía alternativa y de adición de valor a éstos que de otra forma es bajo o son considerados residuos no utilizables. Actualmente con un mejor entendimiento de los aspectos de ingeniería bioquímica, particularmente sobre el modelamiento matemático y el diseño de biorreactores (fermentadores), es posible escalar los procesos de FMS y se han desarrollado algunos diseños particulares para su comercialización (Pandey, 2003).

#### **2.1.1 Definición**

La fermentación en medio sólido (FMS) se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semi-sólidos en presencia de un bajo contenido de agua libre (Cannel y Moo-Young, 1980; Pandey, 2003). La FMS también puede ser definida como una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permita el crecimiento de dichos microorganismos pero no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida, de manera que se forma una fase gaseosa en los espacios entre las partículas sólidas (Minjares y col., 1997). La FMS es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida (Lonsane y col., 1985), que tiene la propiedad de absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles. Los materiales sólidos pueden ser o no biodegradables, por ejemplo, almidón y celulosa son soportes degradables, mientras que el poliuretano no lo es. El crecimiento de los microorganismos en FMS requiere que éstos crezcan sobre un soporte que difunda nutrientes, bajo una atmósfera gaseosa (Viniestra-González y col., 2003).

La FMS tiene un gran potencial para la producción de enzimas, principalmente en aquellos procesos donde el producto crudo de la fermentación puede ser usado directamente como fuente de enzimas o alimento. Los principales factores que afectan la síntesis enzimática y el crecimiento de los microorganismos en FMS incluyen la selección adecuada del sustrato o soporte inerte, tamaño de partícula, espacio inter-partícula y área superficial, contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ ) del sustrato, humedad relativa de la atmósfera gaseosa, tipo y tamaño de inóculo, control de la temperatura durante la fermentación y remoción del calor metabólico, tiempo de cultivo, como control en la uniformidad de las condiciones ambientales durante la fermentación, velocidad de consumo de oxígeno y velocidad de liberación de  $\text{CO}_2$  (Pandey y col., 1999).

### **2.1.2 Ventajas y desventajas de la FMS**

Doelle y col. (1992) consideran como ventajas de la FMS los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente se emplean subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios. Esto significa que en la FMS el sustrato puede requerir menor pretratamiento que en la fermentación en medio líquido (FML).
- La limitada disponibilidad de agua puede ser de gran ayuda para evitar la contaminación, especialmente de bacterias y levaduras, sin embargo la contaminación por otros hongos puede ser un problema.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar biorreactores más pequeños, en comparación con los utilizados en la FML. Biorreactores más pequeños significan menores costos. Esto también significa que pueden tener mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte debido a los espacios inter-partícula, lo que permite una alta transferencia de oxígeno y aire fresco a las delgadas capas de agua en la superficie del sustrato.

- Pueden emplearse, frecuentemente inóculos de esporas en los procesos que involucran hongos. Esto evita la necesidad de grandes tanques de semilla. Sin embargo las esporas tienen fases lag más largas debido a que deben germinar.
- Los procesos de separación o purificación y de disposición de desperdicios son simplificados o minimizados. Varias veces es usado el producto total obtenido de la fermentación, especialmente si tiene por objeto ser empleado como complemento alimenticio. Esto hace que estos procesos puedan ser considerados tecnologías limpias.
- La producción de enzimas degradadoras de carbohidratos es mayor en este tipo de procesos (Nakadai y Nasuno, 1988).
- No se observa represión catabólica o inhibición por productos finales (Shankaranand y col., 1992; Acuña-Argüelles y col., 1995; Montiel-González y col., 2002). Lo que permite el empleo de mayores concentraciones de sustrato (Gautam y col., 2002) y la obtención de productos más concentrados (Robinson y col., 2001).
- Tiene requerimientos energéticos simples como el composteo y los alimentos fermentados tradicionales (koji, quesos, etc.).

Sin embargo, este tipo de fermentación tiene algunas desventajas, entre las que destacan:

- La FMS está restringida a microorganismos que pueden crecer en reducidos niveles de humedad, y por lo tanto el rango de posibles productos y procesos es más limitado que en FML.
- La remoción del calor metabólico generado durante el crecimiento puede ser un problema, especialmente a grandes escalas.
- La naturaleza sólida del sustrato causa problemas en el monitoreo de parámetros del proceso. Sondas desarrolladas para procesos de FML son varias veces inadecuadas para FMS. Adicionalmente es difícil garantizar la correcta distribución de cualquier sustancia añadida al proceso, por lo que el control de variables tales como el pH, contenido de humedad y concentración de sustrato es virtualmente imposible.
- La transferencia de masa en la fase sólida es limitada a difusión mientras que en FML la transferencia de masa es facilitada por la agitación del líquido.



- Uno de los mayores problemas de la FMS es que varios de los aspectos básicos científicos y de ingeniería aún están pobremente caracterizados. Mucho del trabajo obtenido a fecha es ya sea cualitativo o empírico debido a las dificultades encontradas en la cuantificación.
- El proceso de fermentación comparado con la FMS es más largo que la FML, debido a las bajas tasas específicas de crecimiento de los microorganismos. Esto se ha encontrado especialmente en la producción de proteína por hongos a partir de lignocelulosa.

### **2.1.3 Consideraciones para la FMS**

La transformación microbiana aerobia de materiales sólidos o "fermentación en medio sólido" (FMS) puede ser definida en términos de las siguientes propiedades (Raimbault, 1998):

- La matriz sólida porosa que puede ser biodegradable o no, debe tener un área de superficie de contacto por unidad de volumen grande, en el rango de  $10^3$  a  $10^6$  m<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>, para un crecimiento microbiano fácil sobre la interfase sólido-gas.
- La matriz puede absorber agua en una cantidad de varias veces su peso seco con una actividad de agua relativamente alta en la interfase sólido-gas que permite altas tasas de procesos bioquímicos.
- Una mezcla de aire con oxígeno y otros gases y aerosoles deberá fluir bajo una presión relativamente baja y mezclarse con la masa de fermentación.
- La interfase sólido-gas deberá ser un buen hábitat para el rápido desarrollo de cultivos específicos de hongos, levaduras o bacterias, ya sea en cultivos puros o mixtos.
- Las propiedades mecánicas de la matriz sólida permitirán la compresión o agitado suave, como se requiere en algunos procesos de fermentación. Esto requiere pequeñas partículas granulares o fibrosas, las cuales no tiendan a adherirse o romperse unas a otras.
- La matriz sólida no deberá estar contaminada por inhibidores de actividades microbianas y deberá ser capaz de absorber o contener nutrientes microbianos

disponibles tales como carbohidratos (glucosa, fructosa), fuentes de nitrógeno (amonio, urea, péptidos) y sales minerales.

## **2.2 Parámetros ambientales de la FMS**

Las condiciones ambientales tales como temperatura, pH, actividad de agua, niveles de oxígeno y concentración de nutrientes y productos, afectan significativamente el crecimiento microbiano y la formación de productos. Mientras que en los cultivos agitados sumergidos, el control ambiental es relativamente sencillo debido a las condiciones de homogeneidad de la suspensión de células microbianas y de la solución de nutrientes en la fase líquida.

El bajo contenido de humedad de la fermentación en medio sólido (FMS) permite que el volumen del biorreactor por masa de sustrato sea más pequeño que en los cultivos sumergidos para el cultivo microbiano y también simplifica la recuperación del producto (Moo-Young y col., 1983). Sin embargo, surgen serios problemas respecto al mezclado, intercambio de calor, transferencia de oxígeno, control de humedad y la localización de gradientes de pH, nutriente y producto, todo esto como una consecuencia de la heterogeneidad del cultivo (Carrizalez y col., 1981; Hesseltine, 1981, 1987). Esta última característica de los cultivos sólidos ocasiona que la medición y control de los parámetros antes mencionados sea difícil, laboriosa y varias veces imprecisa, limitando con esto el potencial industrial de esta tecnología (Kim y col., 1985). Debido a estos problemas, los microorganismos que han sido seleccionados para la FMS son más tolerantes a un amplio rango de condiciones de cultivo (Mudgett, 1986).

### **2.2.1 Contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ )**

El contenido de humedad es un factor íntimamente relacionado con la definición de la FMS y con las características del material biológico. La importancia del agua en el sistema es debido al hecho de que la gran mayoría de las células viables están caracterizadas por un contenido de humedad de 70 - 80%.

El agua presente en un sistema de FMS existe formando un complejo, dentro de la matriz sólida (Cannel y Moo-Young, 1980) en forma de una delgada capa, ya sea absorbida sobre la superficie de las partículas (Reid, 1989) o menos fuertemente enlazada dentro de las regiones capilares del sólido (Mudgett, 1986). El agua libre sólo se presentará una vez que es excedida la capacidad de saturación de la matriz sólida (Laukevics y col., 1984). Sin embargo, el nivel de humedad en el cual la humedad libre se vuelve aparente varía considerablemente entre sustratos y es dependiente de su capacidad para enlazar agua.

Los niveles de humedad en los procesos de FMS, varían entre 30 y 85% (Laukevics y col., 1984; Oriol y col., 1988; Reid 1989) tienen un marcado efecto sobre la cinética de crecimiento. El cultivo de microorganismos en altos niveles de humedad frecuentemente conduce a que las partículas del sustrato se adhieran entre sí o a las paredes del biorreactor (Grant y col., 1978). Además, los espacios entre las partículas son llenados con agua lo cual limita el intercambio de gases y ocasiona que el sustrato se vuelva más vulnerable a la contaminación bacteriana (Moo-Young y col., 1983; Baldensperger y col., 1985; Lonsane y col., 1985; Considine y col., 1987; Han y col., 1987). Por otro lado, a bajos niveles de humedad, se reduce el crecimiento microbiano, la estabilidad enzimática, el hinchamiento del sustrato y la difusión de los nutrientes (Moo-Young y col., 1983; Lonsane y col., 1985). La actividad enzimática es generalmente inhibida en un menor grado que el crecimiento microbiano por reducidos niveles de humedad, ya que se han reportado enzimas responsables de la pudrición de alimentos a un nivel de humedad tan bajo como un 6% (Acker, 1969).

El contenido óptimo de humedad para el cultivo de microorganismos en proceso de FMS es altamente dependiente de las propiedades de enlazamiento del agua en el sustrato. Por ejemplo, el contenido óptimo de humedad para el cultivo de *Aspergillus niger* en arroz fue 40% (Narahara y col., 1982) mientras que sobre pulpa de café fue 80% (Peñaloza y col., 1985), lo cual indica la imposibilidad de emplear el nivel de humedad como un parámetro para predecir el crecimiento de un microorganismo. Generalmente, en la actualidad es aceptado que los requerimientos de agua de los microorganismos debieran ser definidos en términos de la actividad de agua ( $a_w$ ) del medio más que el contenido de agua del sustrato sólido. Este parámetro está definido por el cociente entre la presión de vapor del agua en el sustrato ( $p$ ) con

la presión de vapor del agua pura ( $p_0$ ) a la misma temperatura (Scott, 1957. Este concepto está relacionado con otros parámetros tales como la humedad relativa ( $\%RH = 100 \times a_w$ ) y el potencial de agua ( $\Psi = RT/V \ln a_w$ ; donde  $\Psi$  es el potencial de agua,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura absoluta y  $V$  es el volumen molar del agua) (Griffin, 1981).

### **2.2.1.1 Relaciones del agua con el crecimiento microbiano**

La reducción de  $a_w$  tiene un marcado efecto sobre el crecimiento microbiano (Troller, 1980). Generalmente, una reducción en  $a_w$  aumenta la fase lag de un organismo, disminuye la tasa específica de crecimiento hasta que el crecimiento cesa y genera una baja cantidad de biomasa (Oriol y col., 1988). En general, las bacterias requieren más altos valores de  $a_w$  que los hongos (Jay, 1986), lo que permite a los hongos competir exitosamente en los valores de  $a_w$  encontrados en los procesos de FMS. La  $a_w$  óptima para el crecimiento de un número limitado de hongos usados en los procesos de FMS es de 0.96 como mínimo, donde la  $a_w$  requerida para el crecimiento mínimo es generalmente más grande que 0.9. Esto sugiere que los hongos empleados en procesos de FMS no son especialmente xerofílicos (Pitt, 1975). El mantenimiento de la  $a_w$  para el óptimo crecimiento permite a la biomasa fúngica crecer sin necesidad de esporular.

### **2.2.1.2 Relaciones del agua con la formación de producto**

La formación de productos tales como etanol, compuestos aromáticos, enzimas y toxinas por varias bacterias y hongos es afectada marcadamente por  $a_w$  y el contenido de humedad pero el patrón de repuesta y la mínima  $a_w$  para la formación de producto varias veces difiere del de crecimiento (Troller, 1980; Mildenhall y col., 1981; Hahn-Hägerdal, 1986; Kenyon y col., 1986; Gervais y Battut, 1989). Se conocen reportes para la producción de enzimas y aflatoxinas para un número considerable de hongos en procesos de FMS. Los valores óptimos de humedad se sitúan en el rango de 22.4 a 75% y dependen de la naturaleza del producto, el sustrato y la elección de microorganismo. Los valores óptimos y mínimos de  $a_w$ , difieren para las diferentes enzimas y también son afectados por el tipo de soluto usado para ajustar el  $a_w$ . En procesos de FMS el  $a_w$  en la fase acuosa podría probablemente ser

controlado por las sales y monómeros liberados por la actividad enzimática y podría variar considerablemente dentro de cada sistema de FMS y durante el cultivo.

El nivel óptimo de humedad es afectado por varios parámetros ambientales como el grado de agitación (Deschamps y col., 1985) y la temperatura (Silman y col., 1979; Kim y col., 1985). Además, las condiciones óptimas de humedad para la formación de producto pueden diferir de aquellas para el crecimiento (Grajek y Gervais, 1987) y  $a_w$  podría ser ajustada inicialmente para un crecimiento óptimo y más tarde ser cambiada para optimizar la formación de producto (Narahara y col., 1982).

La estabilidad de las enzimas es afectada por la  $a_w$ . Bajo condiciones de agitación, alta concentración de azúcar pero no de NaCl conducen a la pérdida de actividad de la pectato liasa. La estabilidad de las enzimas producidas por procesos de FMS a diferentes niveles de humedad ha sido muy poco investigada.

### **2.2.1.3 Factores que afectan el cambio de $a_w$ en procesos de FMS**

En procesos de FMS donde el control no es aplicado, el  $a_w$  y el contenido de humedad del sustrato pueden aumentar o disminuir dependiendo de las condiciones bajo las cuales el proceso de FMS es dirigido. La evolución de calor catabólico puede conducir a un rápido descenso en el contenido de humedad debido a la evaporación, particularmente si se emplea aireación forzada. En ciertas instancias donde el cultivo ha sido aireado con aire saturado de agua, se ha observado un incremento en el nivel de humedad (Lindenfelser y Ciegler, 1975; Nishio y col., 1979). Esto sugiere que la pérdida o ganancia de humedad por los sólidos durante el crecimiento microbiano puede ser extremadamente sensible al contenido de humedad de la fase gaseosa. Grandes cambios en el contenido de humedad en el estado sólido pueden resultar de pequeños cambios en la humedad relativa de la fase gaseosa en equilibrio con los sólidos, dependiendo de las características de sorción-desorción del sustrato (Mudgett, 1986).

La acción microbiana sobre el sustrato puede conducir a un cambio en el  $a_w$  del sustrato. La oxidación de carbohidratos libera agua, lo que incrementa la  $a_w$  del sustrato si el agua no es removida durante el proceso (Lindenfelser y Ciegler, 1975; Raimbault y Alazard, 1980; Durand y Chereau, 1988). Sin embargo, la cantidad de agua producida por el metabolismo es insuficiente para reemplazar el agua perdida por evaporación durante la aireación forzada (Reid, 1989). Debido a que tanto evaporación como formación de agua puede ocurrir en procesos de FMS, el aumento o descenso de  $a_w$  reflejará la diferencia en la contribución relativa de cada proceso.

#### **2.2.1.4 Medición y control de $a_w$ en procesos de FMS**

La medición de la humedad relativa del “headspace” del biorreactor ha sido usada para determinar la  $a_w$  del sustrato en procesos de FMS. Esta aproximación asume que la fase gaseosa está en equilibrio con la fase acuosa del sustrato. El contenido de humedad del sustrato en el biorreactor, sin embargo, podría variar lo cual podría no reflejarse en el “headspace” del biorreactor. Gervais (1989) diseñó un sensor que puede ser colocado dentro de la matriz del sustrato y ser capaz de medir más precisamente la  $a_w$  del sustrato.

El control de la  $a_w$  en los procesos de FMS, para maximizar el crecimiento y la formación de producto ha demostrado tener dificultades. En estudios de laboratorio, se ha intentado el control de  $a_w$  a través, de la adición de sustrato húmedo al sistema de FMS (Sato y col., 1982) o por medio del cultivo en una atmósfera con  $a_w$  constante controlada con soluciones salinas saturadas (Sato y col., 1983). Condiciones que permitan una acumulación de la humedad durante la FMS pueden conducir a la contaminación del proceso por bacterias.

En ocasiones el contenido de humedad ha sido controlado pasando la corriente de entrada de aire a través de soluciones salinas saturadas a diferentes valores de  $a_w$  (Bajracharya y Mudgett, 1980; Sato y col., 1983). Posiblemente el medio más adecuado para la regulación de la humedad sea a través de la humedad relativa del aire usado en la aireación (Laukevics y col., 1984). El contenido de agua en la entrada de aire puede ser controlado al emplear la relación entre la temperatura y la humedad relativa. La humedad relativa en la entrada de aire

en biorreactores de FMS a escala de laboratorio ha sido controlada pasando el aire a través de agua y subsecuentemente calentando el aire para lograr la humedad relativa deseada, sin embargo, el tiempo requerido para equilibrar la  $a_w$  del sustrato puede ser mayor a 30 h (Gervais y Bazelin 1986; Durand y col., 1988). Incrementar la tasa de flujo de aire acoplada a un control de la humedad podría mantener también la  $a_w$  del sustrato (Durand y col., 1988).

## **2.2.2 Temperatura y transferencia de calor**

Los procesos biológicos se caracterizan por operar en un intervalo de temperaturas estrecho. La importancia de la temperatura en el desarrollo de un proceso biológico es tal que puede determinar efectos tan importantes como la desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática, inducción o inhibición de la producción de un metabolito particular, muerte celular, etc.

### **2.2.2.1 Generación de calor metabólico.**

Los procesos quimioheterotróficos son exotérmicos y la generación de calor por altos niveles de actividad microbiana dentro de los sólidos puede conducir a gradientes térmicos impuestos por la limitada capacidad de transferencia de calor de los sustratos sólidos (Mudgett, 1986), lo cual podría ser contraproducente para la formación de biomasa o producto. Debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen que es típica de los procesos en estado sólido, la generación de calor microbiano por unidad de volumen es mucho más grande que la que se genera en los cultivos líquidos (Smith y Aidoo, 1988). En procesos aerobios, la generación de calor puede aproximarse utilizando tasa de evolución de  $\text{CO}_2$  o de consumo de  $\text{O}_2$ . De acuerdo con Reid (1989) cada mol de  $\text{CO}_2$  producido durante la oxidación de lignina libera aproximadamente 475 KJ de calor. Por lo tanto, es importante medir la evolución de  $\text{CO}_2$  durante los procesos de FMS ya que está directamente relacionada al riesgo del incremento de temperatura. La tasa de generación de calor metabólico puede aproximarse a partir de la tasa de evolución de  $\text{CO}_2$ .

### **2.2.2.2 Transferencia de calor y control de temperatura**

La tasa global de transferencia de calor puede ser limitada por la tasa de transferencia de calor intra- e inter-partícula, por la tasa de transferencia de calor de la superficie de la partícula a la fase gaseosa, o por la tasa a la cual el calor en la fase gaseosa es removido. Las características térmicas del material orgánico y el bajo contenido de humedad en la FMS crean condiciones especialmente difíciles para la transferencia de calor (Saucedo-Castañeda y col., 1990).

La tasa de transferencia conductiva de calor dentro de una partícula sólida puede predecirse por partículas de geometría conocida y estructura homogénea, y es afectada por la conductividad térmica y tamaño de la partícula (Bird y col., 1960). La tasa de transferencia de calor de un sólido a la fase gaseosa puede ser aumentada considerablemente a través de flujo forzado en grandes cantidades de gas pasando las partículas sólidas. Donde no hay dicha convección forzada, el calor tiene que ser transferido del sólido a la fase gaseosa por conducción y entonces tiene que difundir a través de la masa del gas al ambiente generando grandes variaciones concomitantes en el contenido de calor dentro de la matriz como es en el caso de las pilas de composta (Finger y col., 1976). Se han desarrollado ecuaciones para la predicción de tasas de transferencia de calor en varias geometrías de biorreactores, como lechos empacados, lechos fluidizados o rectores rotatorios (Perry, 1984). Saucedo-Castañeda y col. (1990) desarrollaron un método matemático para evaluar el mecanismo fundamental de transferencia de calor en FMS estático y más específicamente para evaluar la importancia de la convección y conducción en la disipación de calor. Los autores proponen que este modelo puede ser usado como una base para la automatización del control de biorreactores estáticos.

La remoción del calor es probablemente el factor más crucial que limita el escalamiento en los procesos de FMS en gran escala (Laukevics y col., 1984). Los dispositivos convencionales de enfriamiento por conducción o convección son inadecuados para disipar el calor metabólico debido a la pobre conductividad térmica de la mayoría de los sustratos sólidos y genera gradientes inaceptables de temperatura. Únicamente los dispositivos de enfriamiento evaporativo proveen la suficiente capacidad para la eliminación de calor (Prior y



col., 1992). Sin embargo, la función primaria de la aireación durante los FMS aerobios es suministrar oxígeno para el crecimiento celular y arrastrar hacia fuera el dióxido de carbono producido, también sirve una función crítica en transferencia de calor y humedad entre los sólidos y la fase gaseosa. El más eficiente proceso para el control de la temperatura es la evaporación de agua.

La tasa de evaporación, y por lo tanto la tasa de enfriamiento, pueden ser controladas regulando la tasa de flujo de aire seco o de la humedad del aire que fluye a través de la cámara de cultivo. Un incremento en la tasa de aireación puede aprovecharse para reducir la temperatura del sustrato. Cuando la temperatura es demasiado baja, una disminución en la tasa de aireación permitiría que la temperatura aumente debido a la respiración microbiana. En el último caso deberá tenerse cuidado para prevenir que se presenten condiciones de limitación de oxígeno (Cannel y Moo-Young, 1980). El aire seco puede remover una cantidad de calor mayor que el aire saturado con humedad; la energía requerida para saturar el aire seco con agua a 25° C requiere de 58.2 J/L (Reid, 1989). Sin embargo, el enfriamiento no-homogéneo puede ser un problema y la circulación de aire insaturado causará secado local del sustrato.

Mantener simultáneamente constantes la temperatura y el contenido de humedad a gran escala generalmente presenta dificultades (Tengerdy, 1985). El tipo de biorreactor puede tener una gran influencia sobre la calidad del control de temperatura logrado. Barstow y col. (1988) describieron la operación de un sistema integrado de control de temperatura y humedad, donde un programa de computadora con valores preestablecidos de temperatura, humedad y humedad relativa mantuvo constante la temperatura y el contenido de humedad durante el cultivo de *Rhizopus oligosporus* en maíz granular extraído en un biorreactor de tambor rotatorio de 15 L. Aire seco fue introducido a través del sustrato para forzar el enfriamiento evaporativo, el cual fue balanceado rociando agua fría sobre el sustrato para mantener el contenido de humedad constante.

### **2.2.2.3 Rangos de temperatura para el crecimiento y formación de producto**

La respuesta de los diferentes microorganismos usados en la deslignificación hacia la temperatura varia. La mayoría de los hongos de pudrición blanca son mesófilos con una temperatura óptima de 15 a 35° C, sin embargo, unos pocos microorganismos como *Phanerochaete chrysosporium*, son termófilos moderados (Reid, 1989). Zadrazil y Brunnert (1981) notaron que en varias especies la selectividad a la deslignificación disminuyó cuando la temperatura aumentó de 22 a 30° C. Estos autores también reportaron que temperaturas elevadas (30° C) incrementan la degradación por *Trametes hirsuta*, donde a 30° C se tuvieron efectos adversos con *Abortiporus biennis*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus serotinus* y *Pleurotus sajor-caju*. Por el contrario, con los hongos de pudrición blanca *Sporotrichum pulvurentum* y *Dichomitus squalens*, las tasas de degradación aumentaron conforme aumentó la temperatura de 25 a 35° C (Zadrazil y Brunnert, 1982).

### **2.2.3 Transferencia de masa**

Diferentes procesos de transferencia de masa se registran en las fases gaseosa, líquida y sólida de la FMS. En la fase gaseosa de los procesos aerobios, el oxígeno debe ser transferido al sitio de actividad microbiana y el dióxido de carbono y otros gases posiblemente inhibitorios deben ser removidos del mismo sitio. En las fases acuosas y sólidas, los nutrientes difunden hasta el microorganismo, las enzimas migran dentro de las partículas sólidas y los productos formados se alejan del sitio de reacción. La humedad también puede ser añadida o removida de la fase acuosa dependiendo de la humedad relativa de la fase gaseosa. Cualquiera de los siguientes procesos de transferencia de masa puede ser una limitante para el crecimiento global o para la formación de productos:

- a) Difusión de gases hacia y desde las superficies sólidas.
- b) Adsorción y desorción de los reactantes y productos sobre y desde la superficie.
- c) Difusión de los reactantes y productos a lo largo de la superficie de las partículas.
- d) Difusión de los nutrientes y enzimas dentro de las partículas porosas.

Cualquiera de estos procesos de transferencia de masa podría limitar el desempeño global del sistema dependiendo del tipo de biorreactor, la naturaleza de la matriz sólida y la cinética de las reacciones microbiológicas. Si la tasa de la reacción es intrínsecamente rápida puede suceder que uno de estos procesos de transferencia de masa limite la tasa de reacción global. El más lento de los pasos de transferencia de masa se convierte en el paso limitante de la tasa.

### **2.2.3.3 Aireación**

La aireación cumple con cuatro funciones principales en la FMS (a) mantener las condiciones aerobias, (b) retirar el dióxido de carbono, (c) regular la temperatura del sustrato y (d) regular el nivel de humedad (Durand y col., 1988). El ambiente gaseoso puede afectar significativamente los niveles relativos de biomasa y la producción de enzimas (Mudgett y col., 1982).

La tasa óptima de aireación en un proceso FMS estará determinado por la naturaleza del microorganismo empleado, los requerimientos particulares de oxígeno para el crecimiento y la síntesis de producto sobre los nutrientes dados, la cantidad de calor metabólico que debe ser disipada, el grado al que el CO<sub>2</sub> y otros metabolitos volátiles son eliminados, el espesor del sustrato y su densidad de empaque (inversamente relacionada con el volumen de espacio del poro) y el contenido de humedad (Lonsane y col., 1985). En algunos casos una aireación elevada es esencial para una productividad óptima. (Silman y col., 1979; Silman, 1980).

En las FMS se permite el libre acceso del oxígeno atmosférico hacia sustrato. La aireación puede ser más fácil debido a la rápida tasa de difusión de oxígeno dentro de la delgada capa de agua que rodea las partículas insolubles de sustrato, y también debido a la superficie de contacto muy grande entre la fase gaseosa, sustrato y micelio aéreo (Han, 1987). El control de la fase gaseosa y del flujo de aire es un medio simple y práctico para regular la transferencia de gases y generalmente no se observan limitaciones de oxígeno en FMS cuando el sustrato sólido está constituido de partículas. Es importante mantener un buen balance entre

las tres fases en la FMS. Por este simple proceso de aireación, también es posible inducir reacciones metabólicas, ya sea por estrés de agua, estrés de calor o cambios de temperatura.

Un parámetro para expresar la aireación en un sistema de cultivo como las FMS en particular es obtenido por la intensidad de flujo de aire o  $VKgM$ . Este valor es el flujo de aire expresado por unidad de peso de sustrato, comúnmente como  $L_{aire} \cdot Kg^{-1} \cdot m^{-1}$ . Debe quedar claro que el peso considerado para los cálculos puede ser en base seca o húmeda. Una vez que el nivel de aireación es establecido como un factor intensivo, este valor puede servir como un criterio para escalas más grandes del proceso. Este hecho no significa que ese valor pueda ser tomado como un criterio de escalamiento, pero puede ser usado como un punto de inicio en los nuevos niveles.

#### **2.2.4 Concentración de sustrato y disponibilidad**

Las concentraciones de sustrato en un proceso FMS pueden ser consideradas en términos del espacio total del biorreactor ocupado por la matriz de sustrato sólido y las fases líquida y gaseosa (en un cultivo sumergido) o del sustrato disponible para el microorganismo en la fase líquida o gaseosa. Empacar un biorreactor con cantidades más grandes de sustrato puede ocasionar que el área superficial del sustrato expuesto al aire se reduzca (Silman, 1980).

La concentración de nutrientes en la fase líquida de un proceso FMS ha recibido poca atención. Las limitaciones en el crecimiento por nutrientes es usualmente más severa en FMS debido a las limitadas tasa de difusión de nutrientes y del limitado acceso de los microorganismos a los nutrientes (Moo-Young y col., 1983). La relación C/N es de particular importancia y el valor óptimo puede variar en un amplio rango desde 10 hasta 100 en distintos procesos FMS, sin embargo la disponibilidad de carbono y nitrógeno es de importancia y puede afectar a la relación óptima (Ulmer y col., 1981; MooYoung y col., 1983).

Se supone generalmente que la relación entre la masa de carbono y nitrógeno (C/N) es crucial en un proceso particular para obtener un producto específico. Este argumento es válido cuando el metabolito a producir no está asociado al crecimiento o incluso parcialmente

asociado y cuando las fuentes de carbono y nitrógeno son biodisponibles. En el caso cuando el metabolito está asociado al crecimiento es mejor que desde el principio del proceso el medio este equilibrado. Por otro lado, cuando se trata de hongos, es necesario tomar en cuenta como la relación C/N puede inducir o retrasar la esporulación.

La esporulación de los hongos filamentosos también está regulada por efectos metabólicos causados por la disponibilidad de nutrientes. Se ha señalado que la esporulación es el factor limitante definitivo en la producción de biomasa fúngica y que en la FMS los cambios ambientales ocasionan incremento en la esporulación debido a la lenta difusión y a la convección limitada desde un microorganismo esencialmente inmóvil.

Como sucede en las fermentaciones líquidas, las altas concentraciones de nutrientes en los sistemas FMS pueden causar represión de la formación de producto. En la investigación de la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* se encontró que adoptando un procedimiento de lote alimentado para la adición de almidón soluble al medio de salvado de trigo, el rendimiento fue mejorado un 18.2% en comparación con un proceso convencional de FMS por lote (Kumar y Lonsane, 1987). Esto fue atribuido a que se eludió la inhibición por sustrato de la producción de ácido giberélico debido a la fuente de carbono de almidón.

### **2.2.5 Concentración de productos y rendimiento**

Los procesos de FMS pueden afectar la concentración y rendimientos de productos microbianos así como sus propiedades en comparación con las fermentaciones líquidas o sumergidas. La productividad por unidad de volumen de enzimas de varios hongos es más grande en FMS que en fermentación líquida (Grajek, 1987; Wang y col., 1974) y la alta actividad enzimática en la fase líquida puede reducir los requerimientos energéticos para la extracción (Bajracharya y Mudgett, 1980).

Las propiedades cinéticas de las enzimas producidas por FMS pueden diferir de aquellas producidas por cultivo sumergido. Por ejemplo, la xilanasas de *Aspergillus niger*

producida en FMS fue más termoestable que la obtenida por fermentación líquida y también se manifestó en un pH óptimo cercano a 3.8 en oposición a 4.5 (Deschamps y Huet, 1985).

La inhibición por producto por el etanol producido en FMS es similar a la observada en la fermentación sumergida. Una concentración de etanol al 12% (w/w) inhibió la producción adicional de etanol sobre maíz tratado enzimáticamente por *Saccharomyces cerevisiae* en FMS (Han y Steinberg, 1986). La adición de agua durante el proceso no sirvió para incrementar la concentración final de etanol pero mejoró la tasa de conversión del almidón. Concentraciones más grandes (13.9% w/w) y conversiones de almidón (70.3%) fueron logradas usando la levadura del sake.

### **2.2.6 pH**

El pH es uno entre los otros factores más importantes para cualquier proceso de fermentación. Cada microorganismo posee un rango de pH para su crecimiento y actividad con un valor óptimo dentro del rango.

#### **2.2.6.1 Factores que ocasionan cambios en el pH**

El pH de un cultivo puede cambiar en respuesta a las actividades metabólicas microbianas debido a varias razones. La más obvia es la secreción de ácidos orgánicos como ácido acético ó ácido láctico, los cuales ocasionan un descenso en el pH. Por otro lado la asimilación de ácidos orgánicos que pueden estar presentes en ciertos medios puede conducir a un aumento en el pH.

La utilización microbiana de la fuente de nitrógeno también puede causar que el pH cambie (Wang y col., 1979; Conney, 1981). Con sales de amonio el pH usualmente disminuirá durante el crecimiento microbiano. Debajo de pH 9 el amonio existe como  $\text{NH}_4^+$  es incorporado dentro de la célula bacteriana como  $\text{R-NH}_3^+$  (donde R denota un esqueleto de carbono) de tal manera que un ión de hidrógeno es generado durante el consumo de amonio. De manera inversa, cuando el nitrato sirve como fuente de nitrógeno, los iones hidrógeno del medio son consumidos para reducir los iones de nitrato a  $\text{R-NH}_3^+$ , causando que el pH se

eleva. El pH también tiende a aumentar si compuestos amino orgánicos son desaminados cuando son usados para el crecimiento.

La utilización de nitrato de amonio puede inicialmente causar una acidificación del medio durante la asimilación del amonio cuando la asimilación del nitrato está reprimida, con una subsiguiente alcalinización cuando comienza a emplearse el nitrato como fuente alternativa de nitrógeno una vez que el amonio se ha agotado (Morton y MacMillan, 1954).

Cuando la urea es empleada en un medio, el pH puede aumentar debido a su descomposición, el grado de pH incrementa dependiendo de la concentración de urea (Mitchell y col., 1988a). El sustrato sólido por si solo también puede cambiar el pH.

#### **2.2.6.2 Rangos de pH para el crecimiento microbiano**

En los cultivos en estado sólido es muy difícil controlar el pH; por lo tanto es deseable que el microorganismo usado tenga un amplio rango de pH y un pH óptimo para su crecimiento (Mitchell y col., 1988a). La mayoría de los microorganismos crecen sobre un rango de pH de 3 a 4 unidades, con el pH óptimo para su crecimiento sobre un rango de pH de 1.5 unidades (Wang y col., 1979). Las bacterias en general tienen un pH óptimo entre pH 6.5 a pH 7.5, con límites inferiores y superiores para crecimiento usualmente entre pH 4 y pH 9. Los hongos generalmente prefieren ambientes más ácidos. Los hongos filamentosos crecen bien dentro de un rango de pH de pH 2 a pH 9, con un óptimo en la región de pH 3.8 a pH 6, mientras que las levaduras tienen un pH óptimo entre pH 4 y pH 5 y crecerán dentro de un rango de pH 2.5 a pH 8.5 (VanDemark y Batzing, 1987; Cooney, 1981). La mayoría de los hongos de pudrición blanca, usados para la deslignificación, crecen mejor entre pH 4 y pH 5 (Reid, 1989).

#### **2.2.6.3 Control de pH**

El control del pH por adición de álcali o ácido, que es una práctica común en las fermentaciones sumergidas, es impráctica en la FMS. Puede obtenerse un grado de control del pH en FMS usando diferentes relaciones de sales de amonio y urea en el sustrato. La hidrólisis

de la urea libera amoníaco, el cual contrarresta la rápida acidificación que resulta de consumo del ión amonio (Raimbault y Alazard, 1980; Mitchell y col., 1988a, b; Yang, 1988). Cuando se usó una razón de 3:2 de amonio a urea, se observó que durante la primera etapa del cultivo el pH aumenta conforme la urea es hidrolizada (Raimbault y Alazard, 1980). Durante el subsiguiente crecimiento rápido la asimilación excede la tasa de hidrólisis de la urea y el pH disminuye, pero aumenta de nuevo en la fase estacionaria. En todo el cultivo el pH se encuentra entre los límites de pH 5 a pH 6.2, ya que a una menor concentración de urea resulta en una rápida disminución en el pH, el grado de cambio en el pH depende del nivel de urea.

El control del pH es uno de los problemas aún no resuelto en los procesos de FMS. Este problema se debe a la carencia de equipos y electrodos apropiados para determinar el pH en materiales sólidos y a la existencia de gradientes de pH debido a las características heterogéneas del proceso

### **2.3 Principios generales en el diseño y operación de biorreactores para FMS**

Como sucede con las fermentaciones sumergidas, el diseño de biorreactores es un factor de vital importancia que determina la eficiencia de los procesos de FMS. Los aspectos tales como criterios de selección, consideraciones de diseño, tipos de biorreactor y escalamiento de biorreactores son muy importantes. Lamentablemente, el diseño de biorreactores para FMS hasta la fecha ha sido casi enteramente empírico.

#### **2.3.1 Criterios de selección**

La elección del diseño del biorreactor depende de varios factores como la aplicabilidad del proceso a ser desarrollado, la infraestructura disponible, la experiencia disponible, el escalamiento deseado, y las consideraciones económicas (Cannel y Moo-Young, 1980). Las consideraciones importantes en el diseño final del biorreactor incluyen:

- Si requiere o no de mezclado o agitación y como será aplicado.
- El grado de aireación necesario.
- La tasa a la cual el calor debe ser removido.



- Medición y control de parámetros del proceso.
- El tipo de sustrato y sus propiedades y el manejo de sólidos durante la preparación, inoculación muestreo y procesamiento adicional del medio.
- Esterilización y prevención de contaminación.
- Modo de operación del proceso.
- Criterios de escalamiento.
- Costos de capital y operativos.

Los criterios dominantes son diferentes tanto para operación de laboratorio orientada a la investigación como la operación orientada a la producción. Las consideraciones críticas de diseño serán discutidas a continuación aunque las reglas definitivas para el diseño de biorreactores todavía no han se conocen.

### **2.3.2 Consideraciones que afectan el diseño y la operación**

En un proceso de fermentación, el biorreactor provee del ambiente para el crecimiento y la actividad de los microorganismos. El uso de una matriz sólida, ya sea un soporte inerte o un soporte-sustrato, tiene implicaciones relevantes sobre los aspectos de ingeniería del diseño y operación de biorreactores (Robinson y Nigam, 2003). La maximización de la tasa de formación de producto y su rendimiento dentro del biorreactor son clave en la optimización del proceso. Sin embargo, los sistemas de biorreactores de FMS no han alcanzado aún un alto grado de desarrollo, principalmente debido a problemas asociados a los lechos de sólidos, como pobre mezclado, transferencia de calor y manejo del material. Algunas de las características requeridas en un sistema de biorreactor de FMS son las siguientes (Raghavarao y col., 2003):

- El material de construcción del biorreactor debe ser barato, inerte, resistente a la corrosión y abrasión, no tóxico y capaz de soportar presión (generalmente presión de vapor por esterilización).
- El biorreactor debe ser capaz de trabajar en condiciones asépticas, preferentemente libre de contaminación microbiológica, para prevenir riesgos

accidentales debido a la contaminación biológica, sin embargo algunos procesos como el composteo pueden ser tratados como FMS no estéril.

- El control y regulación de los parámetros operacionales debe ser eficiente; de tal modo que puede ser requerido un sistema de enfriamiento para controlar el calor metabólico generado.
- El sistema del biorreactor debe tener los arreglos apropiados de aireación y agitación que permitan la uniformidad en la biomasa.
- El diseño del biorreactor debe simplificar el mantenimiento, la carga-descarga, muestreo y la recuperación del producto (de acuerdo con los costos laborales de los países en donde el proceso de FMS es desarrollado).

### **2.3.2.1 Agitación**

Los procesos de FMS pueden ser divididos en tres grupos dependiendo del régimen de mezclado que es usado: estáticos, periódicamente agitados y continuamente agitados. La agitación facilita el mantenimiento de condiciones homogéneas dentro del biorreactor, especialmente con respecto a la temperatura y al ambiente gaseoso (Hesseltine, 1977). Además la agitación facilita una distribución uniforme de cualquiera de los aditivos que pudieran ser añadidos durante el proceso. Esto puede ser de vital importancia cuando es necesario añadir nutrientes periódicamente (Kumar y Lonsane, 1987, 1988) o cuando es necesario añadir agua para controlar el contenido de humedad o si es necesario añadir ácido o base para el control del pH. Dependiendo de las propiedades del sustrato, la agitación puede prevenir u ocasionar la aglomeración de sólidos.

La carencia de agitación tiene influencia sobre la profundidad del sustrato que puede ser usado. En FMS estática se han observado gradientes por arriba de los 3° C por centímetro (Rathbun y Shuler, 1983). Además, si no se emplea aireación forzada para la FMS estática, el oxígeno en los espacios inter-partículas puede caer a niveles limitantes y el dióxido de carbono elevarse a niveles inhibitorios.

En la FMS periódicamente agitada, la agitación sirve para surtir de nuevo los espacios inter-partículas con aire fresco. La frecuencia del mezclado depende de la fracción de espacio vacío en el sustrato. La fracción de espacio vacío depende de propiedades del sustrato tales como el tamaño y forma de la partícula. También depende del contenido de humedad, ya que un exceso de la misma desplaza al aire. Obviamente, mientras más grande sea la fracción de espacio vacío, más oxígeno está presente en la masa de sustrato y será menos necesaria una agitación frecuente para llenarlos de nuevo con aire fresco (Cannel y MooYoung, 1980). La frecuencia de mezclado también estará determinada por las necesidades de enfriamiento del sustrato, el cual estará determinado por la tasa de crecimiento y a la producción asociada de calor metabólico.

Sin embargo el mezclado de sustratos sólidos puede también tener efectos dañinos, incluyendo efectos adversos sobre la porosidad del sustrato, rompimiento de adhesión del microorganismo al sustrato y dañar al micelio fúngico debido a los fuerzas de corte causadas por la abrasión entre las partículas. Las fuerzas de corte en FMS son complejas y difíciles de caracterizar.

Los hongos son particularmente susceptibles a las fuerzas de corte. Tanto las hifas superficiales como inter-partículas pueden ser rotas por fuerzas cortantes. La ruptura de las hifas inter-partículas puede tener alguna ventaja ya que previene que el hongo enlace las partículas de sustrato en una sola masa (Lindenfelser y Ciegler, 1975). Las hifas aéreas son maceradas sobre la superficie del sustrato, provocando una inhibición de la esporulación (Bajracharya y Mudget, 1979; Silman, 1980). Debido a lo anterior las fermentaciones estáticas son necesarias para la preparación de inóculo de esporas. En otros casos tales como el enriquecimiento por proteína de sustratos sólidos, la inhibición de la esporulación puede ser una ventaja, ya que la esporulación hace al producto menos atractivo.

Los sistemas de agitación en biorreactores de FMS pueden ser diseñados para minimizar los efectos dañinos del mezclado. Se ha descrito un listo helicoidal diseñado para evitar la compactación del sustrato y el corte del micelio (Tengerdy, 1985).

Se ha cuestionado la importancia del daño al micelio en la restricción del crecimiento en FMS (Aidoo y col., 1984). Ya que se señala que la agitación estimula el crecimiento inicialmente a tal grado que el calor metabólico generado no puede ser fácilmente removido conduciendo a un sobre calentamiento del sustrato. Es posible que los efectos dañinos del mezclado tengan diferentes causas subyacentes en diferentes aplicaciones de FMS. El balance entre los efectos favorables y desfavorables del mezclado también diferirá en diferentes sistemas sustrato-microorganismo-biorreactor de FMS. De cualquier manera la agitación solo debería ser provista si es necesaria, y la agitación periódica suele ser suficiente (Laukevics y col., 1984).

### **2.3.2.2 Aireación**

Debido a que la mayoría de los procesos de FMS involucran microorganismos aerobios, la transferencia de oxígeno a la biomasa en la superficie de las partículas de sólido es de primordial importancia. La aireación también puede jugar un papel importante en la remoción de calor metabólico y también de gases y otros metabolitos volátiles desde los espacios inter-partícula y del “headspace” del biorreactor.

Si la aireación forzada no es usada en el proceso de FMS, es esencial reabastecer los gases en el “headspace” del biorreactor. Donde se emplea aireación forzada, es más común hacerlo con el soplado de aire hacia arriba a través del sustrato soportado en una base plana perforada. Es importante obtener una distribución equitativa del aire para evitar que se formen canales de flujo de aire. Sin embargo, la base plana debe tener un gran número de orificios pequeños en vez pocos orificios grandes. En el único caso donde ésta recomendación no se aplica es para el biorreactor de lecho en forma de cono en el cual un chorro de aire es forzado a través del orificio ocasionando la circulación de los sólidos en el lecho. Tal diseño debe lograr el mezclado y la aireación en un solo paso, sin embargo la aplicación de este diseño de biorreactor para FMS aún no ha sido publicada.

En los biorreactores de lecho empacado, tanto la transferencia de calor y masa son importantes, y en la FMS en biorreactores de lecho empacado, el sobre calentamiento es uno

de los problemas principales (Saucedo-Castañeda y col., 1992; Gowthaman y col., 1993), debido al flujo unidireccional del aire. Conforme el aire pasa a través de la columna y remueve el calor del sustrato, el aire se calienta, perdiendo eficiencia para enfriar a través de la columna. Consecuentemente, se establece un gradiente de temperatura a lo largo de la columna con la temperatura más alta en la salida final del lecho.

### **2.3.2.3 Remoción de calor**

Los procesos de FMS se caracterizan por la generación de grandes cantidades de calor. Por ejemplo la producción de 13000 KJ por Kg de materia seca es típica en sistemas de composteo (Finger y col., 1976). La velocidad en la que el calor necesita ser removido depende de la actividad metabólica del microorganismo y de la cantidad de sustrato en el biorreactor.

Desafortunadamente la naturaleza sólida del sustrato y su bajo contenido de humedad conduce a tasas muy bajas de transferencia de calor en FMS. En la FMS estática esta pobre transferencia de calor conduce a un gran incremento en la temperatura del sustrato. Durante la fermentación tradicional de koji la temperatura se eleva desde 30° C hasta los 40° C o más (Wood, 1977; Wang y Hesseltine, 1982). En el composteo no agitado la temperatura en el centro puede ser tan alta como 60 a 70° C (Biddlestone y Gray, 1985).

La remoción de calor también puede ser un problema en los sistemas agitados de FMS. Temperaturas de hasta 45° C son varias veces observadas en un experimento de fermentación koji cuando 3 Kg de sustrato son incubados con agitación constante en un biorreactor de 20 L colocado en una cámara a 30° C. El problema se vuelve más severo a escalas más grandes. Las distintas estrategias para la remoción de calor pueden ser resumidas de la siguiente manera:

- Aireación forzada con aire húmedo para remover el calor por conducción.
- Aireación forzada con aire seco para remover el calor por evaporación.
- Enfriamiento de la superficie externa del biorreactor, ya sea con una chaqueta de agua o cubriéndolo con un lienzo humedecido con agua.

- Circulación de agua fría a través de un intercambiador de calor interno.
- Colocación del biorreactor en un cuarto a temperatura controlada o un baño de agua (esto solo es posible a escalas relativamente pequeñas).

Por supuesto, varios de estos métodos pueden ser usados en combinación. La remoción evaporativa de calor es el método más eficiente (Trevelyan, 1974), y puede remover un 80% del calor generado por el crecimiento (Sato y col., 1982). Sin embargo 7 g de agua sería necesarios para remover el calor generado por la oxidación de un 1 g de almidón (Trevelyan, 1974). La pérdida de agua en esta escala representa un problema serio en la FMS donde el contenido de humedad del sustrato es ya bajo. Sin embargo, el enfriamiento evaporativo debe estar acompañado de un abastecimiento de agua.

#### **2.3.2.4 Medición y control de parámetros de proceso**

El contenido de humedad del sustrato puede afectar el diseño del biorreactor ya que la agitación puede causar que los sustratos húmedos se aglomeren o que los sustratos secos se desintegren. Si estos problemas son severos, entonces esto puede limitar el diseño del biorreactor a aquellos con sustrato estático. De igual manera en la FMS estática el contenido de humedad puede ser importante ya que la presencia de agua en exceso en los espacios inter-partícula puede evitar una aireación efectiva.

La aireación forzada tiene usualmente un efecto de secado sobre los sustratos en la FMS, y puede conducir a gradientes en el contenido de agua en la masa de sustrato (Narahara y col., 1984). Puede ser práctico evitar el secado mediante la aireación con aire humidificado, sin embargo esto no permite usar el enfriamiento evaporativo. Alternativamente agua líquida puede ser añadida de manera intermitente al sustrato, ya sea por aspersión del agua o por la introducción de una fina neblina en la corriente de aire.

La medición de pH en línea en FMS es difícil de lograr. En la mayoría de los casos no puede asegurarse un contacto adecuado entre los electrodos de bulbo de vidrio estándar y el sustrato. Están disponibles electrodos de extremo plano, pero sufren tiempos de respuesta

lentos. Además con los electrodos de extremo plano no puede asegurarse contacto con el sustrato especialmente si éste es agitado. De cualquier manera, estos electrodos no son lo suficientemente robustos para soportar las fuerzas presentes en los sistemas de FMS agitados.

Debido a que la medición de varios parámetros de proceso no puede realizarse en línea, deben tomarse muestras periódicamente y ser analizadas fuera de línea. En sistemas no agitados los parámetros de proceso presentan casi siempre variaciones dentro del biorreactor, haciendo prácticamente imposible obtener una muestra representativa. Debe diseñarse el biorreactor de tal manera que tenga varios puertos de muestreo, que permitan que las muestras puedan ser tomadas de varios sitios. La misma consideración se aplica a la colocación de sondas en línea tales como termopares y eventualmente electrodos de pH.

### **2.3.2.5 Modos de operación del biorreactor y clasificación de los procesos de FMS**

La mayoría de las aplicaciones de FMS involucran cultivo por lote. La implementación efectiva de las técnicas de lote alimentado o continuo a gran escala requiere la aplicación de técnicas automatizadas de manejo de sólidos.

La mayoría de los procesos de FMS continuos y por lote alimentado están aun bajo investigación en escala pequeña y semi-piloto. Los procesos de FMS pueden ser divididos dentro de dos grupos:

- Fermentación sin agitación.
- Fermentación con agitación intermitente o continua.

El último grupo puede ser subdividido en cuatro grupos:

- Fermentación con agitación intermitente sin aireación forzada.
- Fermentación con agitación lenta continua sin aireación forzada.
- Fermentación con agitación intermitente con aireación forzada.
- Fermentación con aireación forzada y agitación continua.

Los parámetros de proceso son factores muy importantes a tomarse en consideración para el diseño de biorreactores para FMS. La información disponible sobre el consumo de sustrato, transferencia de oxígeno y cinética de crecimiento no provee datos detallado dentro del diseño del biorreactor.

## **2.4 Biorreactores para FMS**

Cada tipo de biorreactor tiene tres subsistemas, la pared del biorreactor, el lecho del sustrato y los gases del “headspace”. El lecho de sustrato puede por sí mismo ser tratado como un sistema con dos fases separadas, las fases sólida y gaseosa, o puede ser tratada como una sola fase pseudo-homogénea con las propiedades promedio de las fases sólidas y de aire. El arreglo de los subsistemas y su relativa importancia varía con el tipo de biorreactor.

### **2.4.1 Biorreactores de charola**

El más viejo y simple biorreactor es la charola. Las características básicas de la charola son (Mitchell y col., 1992):

- Una capa relativamente delgada de sustrato es extendida sobre un área horizontal relativamente grande.
- No hay aireación forzada, sin embargo, la base de la charola puede estar perforada y el aire puede circularse suavemente alrededor de la charola.
- El mezclado, cuando se aplica, es intermitente y realizado por dispositivos automáticos simples o manuales.
- La temperatura puede variar con el ambiente o la charola puede ser colocada en un gabinete o cuarto con temperatura controlada.

En los procesos de FMS en biorreactor de charola el sustrato sólido es cargado sobre las charolas (hechas de madera, plástico o metal, perforadas o no) en capas delgadas (comúnmente 5 - 15 cm) y colocadas una sobre la otra con un espacio entre ellas de unos pocos centímetros dentro de un cuarto con temperatura controlada. Hay mucha evidencia empírica y experimental de la pobre transferencia de calor y masa en las charolas, limitando el



espesor del lecho de sustrato, que no debe ser más que unos pocos centímetros. Por lo tanto, tales biorreactores tienen restricciones en el volumen de la matriz de sólidos usada: solo una delgada capa puede ser usada para evitar sobrecalentamiento y para garantizar condiciones aerobias. La temperatura y la humedad relativa son sólo los únicos parámetros externos que pueden ser controlados.

El escalamiento en este caso es fácil (incrementando el número de charolas), pero una de las principales desventajas de los biorreactores de charolas es que en operaciones a gran escala no son fácilmente automatizados y por lo tanto hacen uso extensivo de mano de obra, además de requerir una gran área operacional y es difícil aplicarlo a procesos estériles (Pandey, 1991).

#### **2.4.2 Biorreactores de lecho empacado**

Los biorreactores de lecho empacado se caracterizan por tener un sustrato estático soportado sobre una placa base a través de la se aplica aireación forzada (Mitchell y col., 1992). Son posibles algunas variaciones a este diseño. El diseño típico es una columna cilíndrica alta y delgada. Sin embargo, las charolas perforadas también son usadas y estas pueden ser clasificadas como lechos empacados sobre el criterio de aireación forzada. Otras variaciones pueden ser la celda de madera, el plato cubierto, y las incubaciones verticales y horizontales de células que también pueden ser clasificados como lechos empacados (Lonsane y col., 1985).

De manera común la aireación forzada se aplica en el fondo; sin embargo, en algunos casos desde la parte más alta de la masa de sustrato (Sugama y Okazaki y Sugama, 1979; Wissler y col., 1983). La humedad de aire entrante puede mantenerse alta para minimizar la pérdida de agua del sustrato. De manera similar, la temperatura del aire entrante puede ser manipulada para auxiliar en la regulación de la temperatura de incubación (Narahara y col., 1984), sin embargo, en la mayoría de los casos la temperatura del aire entrante se mantiene constante.

Las columnas pequeñas de hasta 30 cm aproximadamente de longitud pueden ser colocadas en baños de agua para controlar la temperatura (Okazaki y Sugama, 1979; Raimbault y Alazard, 1980; Carrizalez y col., 1981), mientras que las columnas más grandes pueden ser encaquetadas con un serpentín de agua (Sato y col., 1983; Laukevics y col., 1984). Las columnas delgadas tienen una superficie para la transferencia de calor relativamente grande y pueden no requerir dispositivos especiales de enfriamiento, pero para columnas más amplias (con diámetro más grande de 10 cm) es esencial una chaqueta de agua (Silman y col., 1979).

La ventaja de los biorreactores de lecho empacado es que son relativamente simples además de que permiten un mejor control del proceso (especialmente en la temperatura y la humedad) que en los fermentadores de charolas. Debido a lo anterior muchos investigadores han empleado los biorreactores de lecho empacado. Las principales desventajas de los biorreactores de lecho empacado incluyen dificultades con el vaciado del producto final desde el biorreactor, crecimiento no uniforme, pobre remoción de calor, y problemas con el escalamiento (Underkofler y col., 1947; Lonsane y col., 1985).

### **2.4.3 Biorreactores de tambor rotatorio**

Las características básicas de los biorreactores de tambor rotatorio son (Mitchell y col., 1992):

- Un cilindro horizontal o inclinado.
- Rotación del cilindro alrededor de su eje central para causar movimiento de giro del sustrato, el cual puede ser auxiliado por baffles.
- La aireación, cuando se aplica, es con aire alimentado a baja presión dentro del espacio superior (headspace) del biorreactor.

El mezclado provisto por la acción de giro en los biorreactores de tambor rotatorio es relativamente suave, y de todos los métodos de mezclado automático es el que causa el menor daño a los microorganismos o al sustrato. No obstante, pueden surgir problemas debido, ya sea

a la aglomeración de partículas del sustrato o a la reducción de partícula, y que puede afectar a microorganismos que son altamente sensibles al daño abrasivo. Además, el control de temperatura es muy difícil, desde escalas pequeñas, ya que es difícil rodear con una chaqueta de agua al cuerpo con movimiento del biorreactor. Estos problemas aumentan con la escala (Lonsane y col., 1985).

#### **2.4.4 Biorreactores agitados**

Los biorreactores agitados son de dos tipos principales dependiendo si el eje del biorreactor es horizontal o vertical. Los biorreactores agitados horizontales son muy similares a los biorreactores de tambor rotatorios excepto que el mezclado es provisto por aspas internas, más que por la rotación del cuerpo del biorreactor. Los biorreactores agitados verticales son en muchas ocasiones sujetos a aireación forzada. Difieren de los biorreactores de lecho empacado por el hecho de que son agitados y que pueden ser tanto continuos como intermitentes (Mitchell y col., 1992).

#### **2.4.5 Biorreactores de lecho fluidizado aire-sólido**

Si se hace pasar una corriente de gas con una tasa de flujo lo suficientemente alta a través de un lecho de partículas sólidas, los sólidos se suspenden en la corriente de gas. Bajo este estado se dice que el lecho está fluidizado. Para suministros de velocidades de gas por arriba de la mínima velocidad para la fluidización, el lecho toma la apariencia de un líquido en ebullición con los sólidos en movimiento vigoroso y con grandes burbujas elevándose rápidamente a lo largo del lecho. Las características del biorreactor de lecho fluidizado aire-sólido son (Mitchell y col., 1992):

- a) Una columna relativamente alta.
- b) Una base perforada, por la cual pase el aire (u otro gas) inyectado con suficiente velocidad para que las partículas floten.
- c) Un dispositivo de agitación especializado que pueda ser incluido para auxiliar en la agitación de los sólidos.

Las características especiales y ventajas de la tecnología del biorreactor de lecho fluidizado aire-sólido incluyen (Mishra y col., 1982; Bauer y Rottenbacher, 1985; Hong y col., 1988):

- a) Es provista una buena aireación, permitiendo el buen crecimiento de organismos aerobios. Las células en biorreactores de lecho fluidizado aire-sólido fueron capaces de tener tasas de respiración 10 veces más grandes.
- b) El sobre calentamiento no es un problema ya que el calor metabólico es removido por la corriente de aire.
- c) Los productos metabólicos gaseosos y volátiles son rápidamente eliminados evitando sus posibles efectos inhibitorios.
- d) En la elaboración de productos, tales como la proteína unicelular, el secado del producto se puede llevar a cabo en el mismo biorreactor o columnas.
- e) Se logra un mezclado altamente efectivo, evitando problemas de gradientes de temperatura y del contenido de humedad dentro de los biorreactores, permitiendo un excelente control de los parámetros del proceso.
- f) Se pueden obtener productividades mayores a las observadas en procesos de FMS tradicionales, resultando en ahorro de espacio en las plantas y en los costos de operación.

## **2.5 Balances de materia y energía en biorreactores**

El biorreactor puede ser tratado como un todo si se dibuja una frontera al exterior del biorreactor y solo se consideran los intercambios de masa y energía entre el biorreactor y sus alrededores. Las corrientes de aire transportan masa ( $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $O_2$  y vapor de agua) y energía dentro y fuera del biorreactor con la cantidad de energía acarreada dependiendo de su humedad y temperatura. La tendencia para el aire es salir del biorreactor más caliente y llevando consigo más agua que cuando entró, y una temperatura y humedad más alta contribuye a la remoción global del calor del biorreactor. La composición del aire puede ser diferente a la salida y a la entrada. El aire de salida generalmente tiene más  $CO_2$ , menos  $O_2$  y más agua que el de entrada. Por lo tanto en términos de transferencia de masa, el efecto del

flujo de aire no es solo proveer O<sub>2</sub> y remover CO<sub>2</sub>, si no también secar el biorreactor. Debe notarse que es casi imposible prevenir este efecto de secado si el aire se calienta al pasar por el biorreactor.

La energía puede intercambiarse por transferencia convectiva de calor entre las paredes del biorreactor y los alrededores, los cuales podrían ser aire o podrían ser agua en una chaqueta. La convección de calor hacia el exterior de la pared del biorreactor ocurrirá por convección libre si el exterior de la pared del biorreactor está en contacto con el aire en los alrededores y no hay flujo forzado de este aire al pasar el biorreactor. Si el biorreactor está enchaquetado se bombea agua a través de la chaqueta, o si el aire es soplado al pasar sobre la superficie del biorreactor, entonces el aire será removido por convección forzada. La magnitud de la contribución de esta transferencia de calor en la remoción total de calor dependerá de la escala del biorreactor. En el laboratorio, los pequeños biorreactores tienen una gran relación superficie-volumen, y ésta remoción de calor puede tener una gran contribución. A gran escala, la relación superficie-volumen será más pequeña, por lo tanto la contribución de este mecanismo en la remoción total de calor puede ser muy pequeña o incluso despreciable.

### **2.5.1 Balances de calor**

Como se ha mencionado previamente, la energía producida durante el proceso de fermentación es responsable de factores tales como la elevación de la temperatura del sistema, la pérdida de agua por evaporación, la demanda de aire, la tasa específica de crecimiento del microorganismo empleado. Por lo anterior, es necesario desarrollar un balance global de calor que permita establecer estas relaciones entre los factores ya mencionados.

El balance macroscópico de calor para un fermentador, en estado no estacionario puede escribirse de la siguiente forma (Gutiérrez-Rojas y col., 1996; Pandey y col., 2001):

$$Q_{acc} = Q_{met} - Q_{exch} - Q_{evap} - Q_{sen} \quad (1)$$

Donde  $Q_{acc}$ , es la tasa de acumulación de calor;  $Q_{met}$ , es la tasa de generación de calor por el crecimiento y mantenimiento celular;  $Q_{exch}$ , es la tasa de transferencia de calor a los

alrededores o al intercambiador;  $Q_{\text{evap}}$ , es la tasa de pérdida de calor por evaporación y  $Q_{\text{sen}}$ , es la tasa de ganancia de entalpía sensible de las corrientes (entrada-salida).

La tasa de acumulación de calor es estimada a partir de la pendiente de la curva temperatura vs tiempo ( $\Delta T/\Delta t$ ) la cantidad de masa de medio de fermentación ( $m$  en Kg) y la capacidad calorífica del medio de fermentación ( $Cp_b$  en  $\text{KJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) mediante la siguiente ecuación (Wang y col., 1979; Atkinson y col., 1991).

$$Q_{\text{acc}} = mCp_b \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (2)$$

La acumulación de calor es considerada como la principal limitación para el crecimiento microbiano en procesos de FMS (Saucedo-Castañeda y col, 1990).

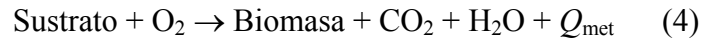
La tasa de transferencia de calor del medio de fermentación al fluido de enfriamiento ( $Q_{\text{exch}}$ ) está dada por la siguiente ecuación (Kargi y Moo-Young, 1985; Bailey y Ollis, 1986; Blanch y Clark, 1997)

$$Q_{\text{exch}} = UA(T_b - T_c) \quad (3)$$

Donde  $U$  es el coeficiente global de transferencia de calor;  $A$  es el área de transferencia de calor; y  $T_b$  y  $T_c$  son las temperaturas del medio de fermentación y del fluido de enfriamiento respectivamente. Las mayores resistencias a la transferencia de calor involucradas son: (1) la resistencia a la transferencia de calor convectiva del fluido de enfriamiento, (2) la resistencia de la pared que separa al medio de fermentación del fluido de enfriamiento, y (3) la resistencia a la transferencia de calor convectiva o conductiva del medio de fermentación.  $U$  está determinada por la geometría y características de la superficie de transferencia de calor y las condiciones de operación (Kargi y Moo-Young, 1985; Bailey y Ollis, 1986; Blanch y Clark, 1997).

Para obtener ecuaciones que correspondan a calor generado (metabólico),  $Q_{\text{met}}$ , en un proceso de fermentación sería conveniente conocer el calor molar de combustión del sustrato

que es consumido. La fermentación es un proceso de combustión que puede ser visto por la siguiente expresión general para un proceso aerobio (Pandey, 2001):



Cooney y Wang (1968) determinaron los valores totales del calor metabólico generado y dióxido de carbono producido encontrando la siguiente correlación:

$$Q_{\text{metT}} = 0.11m_{\text{CO}_2} \quad (5)$$

Donde  $Q_{\text{metT}}$  es el valor del calor metabólico total en Kcal,  $m_{\text{CO}_2}$  es la masa total de dióxido de carbono en mmol. Posteriormente, se mostró teóricamente que se generan 113 J por cada mmol de electrones que son transferidos de los sustratos hasta el aceptor(es) de electrones (Minkevich y Eroshin, 1973; Erickson, 1978). Debido a que 1 mmol de oxígeno molecular puede recibir 4 mmoles de electrones, los valores teóricos concuerdan con las observaciones de Cooney y Wang (1968).

La pérdida de calor como resultado de la evaporación ( $Q_{\text{evap}}$ ) es debida en gran parte al incremento del vapor de agua en la fase gaseosa. Si se asume que el aire entra y sale en condiciones de saturación, pero que el aire que sale del biorreactor está a una temperatura más alta, la pérdida de calor por evaporación puede ser expresada como sigue:

$$Q_{\text{evap}} \approx G\lambda\Delta W \quad (6)$$

Donde  $G$  es el flujo de aire seco,  $\lambda$  es el calor latente de vaporación y  $\Delta W$  es el cambio en el contenido de agua (Atkinson, 1991).

El calor sensible, es decir, la ganancia de energía de las corrientes de aire de salida y de entrada del biorreactor de FMS puede ser calculada a partir de la entalpía del aire. La entalpía del aire generalmente es definida por (Pandey y col., 2001):

$$i = (0.24 + 0.45H)T + \lambda H \quad (7)$$

Donde  $i$  es la entalpía del aire húmedo (kcal/kg aire seco);  $H$ , humedad absoluta del aire (kg agua/kg aire seco);  $\lambda$ , calor latente de vaporización del agua (kcal/kg agua).

### 2.5.2 Balances de agua

El desarrollo de un balance de agua permite conocer el contenido de humedad del lecho como consecuencia de la generación metabólica, el consumo y evaporación de la misma. Esto permitiría evaluar el efecto de las condiciones de operación y estrategias de remoción de calor metabólico sobre el contenido de humedad del lecho de fermentación.

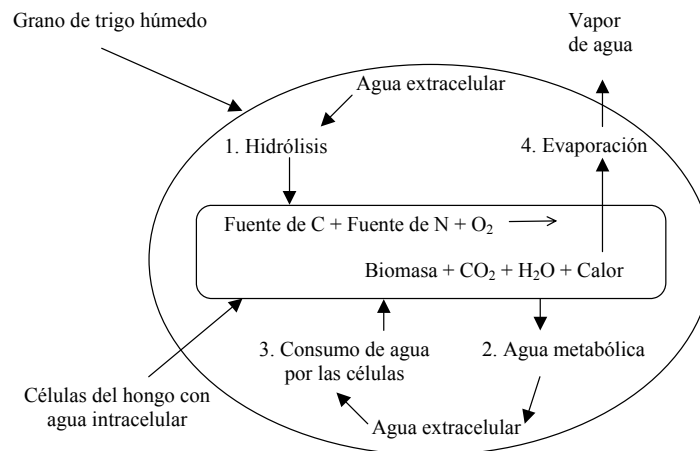
El balance de agua en un proceso de fermentación puede ser ilustrado por la siguiente ecuación (Saucedo-Castañeda y col., 1992):

$$W_{\text{Alim}} + W_{\text{Gen}} - W_{\text{Cons}} - W_{\text{Evap}} = \beta \frac{dW}{dt} \quad (8)$$

Donde,  $W_{\text{Alim}}$ , es el agua añadida al sistema forzando aire húmedo a través del medio;  $W_{\text{Gen}}$  es el agua generada durante las reacciones oxidativas en el medio;  $W_{\text{cons}}$ , es el agua consumida en hidrólisis de almidón y crecimiento microbiano;  $W_{\text{Evap}}$ , es el agua evaporada del sistema por la salida del aire debido al enfriamiento evaporativo;  $dW/dt$  es la variación en el contenido de agua del medio como una función del tiempo y  $\beta$ , es una constante de proporcionalidad.

De acuerdo con Nagel y col. (2001a) el balance de agua durante la FMS consiste de cuatro contribuciones como se muestra en la Figura 2.1, en orden de magnitud ascendente.





**Figura 2.1.** Visión esquemática de las cuatro contribuciones en el balance de agua durante la FMS de granos de trigo. (1) Consumo de agua en reacciones de hidrólisis de la celulosa para formar carbohidratos, (2) Generación de agua metabólica por oxidación de la glucosa en las reacciones biológicas, (3) Incorporación de agua extracelular en el micelio recién sintetizado, (4) Evaporación de agua extracelular por generación de calor metabólico y baja conductividad del sustrato (Nagel y col., 2001b).

Para la estimación del contenido de humedad extracelular a partir de un modelo, no sólo es importante el balance de agua sino también el balance de materia seca. El sustrato sólido es transformado en biomasa,  $H_2O$  y  $CO_2$  y esto afectará tanto al contenido de humedad extracelular como a la materia seca extracelular (Smits y col., 1998; Larroche y col., 1998; Nagel y col., 2001b). Las pérdidas de sustrato sólido son de 25 - 50% del sustrato inicial presente (Nagel y col., 2001b). La tasa de consumo de agua para la hidrólisis puede ser estimada a partir de la química básica, la tasa de producción de agua metabólica por medio de balances elementales, el consumo de agua para la formación de nuevas células a partir de datos acerca del contenido del agua en las células junto con los balances elementales y la evaporación a partir de un balance de entalpía.

## 2.6 Modelamiento en sistemas biológicos

Un modelo es la representación de un sistema real, y puede estar construido con la estructura o función de un sistema real. La palabra modelo puede tener el mismo significado

que concepto, hipótesis o analogía. Debido a que un modelo no puede representar totalmente al sistema real en cada uno de sus detalles, éste puede involucrar varios grados de simplificación o abstracción.

Los modelos juegan un papel importante en la biología. Algunos de los primeros modelos involucraban la observación cuidadosa y dibujo a gran detalle de la morfología de los sistemas bajo investigación.

Las ciencias biológicas involucran más que solo describir y entender los sistemas naturales. La manipulación del ambiente parece ser una característica humana fundamental, y uno de los objetivos del estudio biológico es entender la complejidad de los sistemas vivos para manejarlos “benéficamente”. Ya sea que el manipulador es un médico decidiendo sobre el curso de un tratamiento para un paciente enfermo o un biólogo decidiendo sobre los límites para la caza de venado en una temporada, las decisiones son tomadas con base en un modelo conceptual de la persona que toma las decisiones. La mejora de los modelos conceptuales debe conducir a una mejora en la toma de decisiones (Keen y Spain, 1992).

Los modelos conceptuales son por sí mismos carentes de rigor. Pueden ser imprecisos e interpretados de manera distinta por diferentes personas. Para evitar este problema, los modelos conceptuales deben ser establecidos de una manera precisa de modo que no sea ambiguo y que pueda ser evaluado y validado. Una forma de modelo que ofrece estas ventajas es el modelo matemático (Keen y Spain, 1992).

### **2.6.1 El modelo matemático**

Un modelo matemático puede definirse como una representación de los aspectos esenciales de un sistema existente (o de un sistema a ser construido) el cual presenta conocimiento de ese sistema de manera útil (Eykhoﬀ, 1974).

El modelo matemático de un sistema puede ser tan simple como una sola ecuación relacionando una variable con otra o puede ser un modelo multicomponente incluyendo la interacción de varias ecuaciones teniendo variables mutuamente dependientes. Los modelos

matemáticos pueden ser elaborados a partir de tasa de cambio de sistemas de células, organismos, poblaciones o moléculas respecto al tiempo y bajo el impacto de factores ambientales como la temperatura, luz y pH, entre otros. (Keen y Spain, 1992).

### **2.6.2 Clasificación de los modelos**

Los modelos matemáticos se clasifican por la manera en que se obtienen en dos categorías (Hall y Day, 1977; Edgar y Himmelblau, 1988):

- Basados en teoría física o mecánicos que están basados en un modelo conceptual.
- Basados en descripciones estrictamente empíricas (o también llamados modelo de “caja negra”) o del análisis de datos experimentales.

Los modelos matemáticos basados en leyes físicas y químicas (por ejemplo balances de materia y energía) son usualmente empleados en aplicaciones de simulación y optimización. Estos modelos son conceptualmente atractivos ya que puede construirse un modelo general para sistemas de cualquier tamaño, antes de que el sistema sea construido. Por otro lado un modelo empírico puede ser visto como aquel que simplemente correlaciona datos de entrada y salida sin ningún análisis fisicoquímico del proceso (Edgar y Himmelblau, 1988).

Un modelo puede ser valioso debido a su abstracción y ayuda a evitar la experimentación y observaciones repetitivas. Sin embargo el ahorro en costo potencial y tiempo que ofrece el uso de los modelos matemáticos debe ponderarse contra el hecho de que el modelo solo imita la realidad y no incorpora todas las características del sistema real que se modela. En el desarrollo de un modelo, el usuario debe decidir qué factores son relevantes y que tan complejo deberá ser el modelo. Se deben considerar las siguientes cuestiones (Edgar y Himmelblau, 1988):

- Nivel a que debe ser modelado el proceso (macroscópico o microscópico) y que nivel será necesario para cualquier acercamiento.

- Si el proceso puede ser descrito adecuadamente usando principios de física y química.
- Nivel de exactitud deseado en el modelo y como afecta su exactitud en el uso final.
- Mediciones y datos disponibles para la verificación del modelo.
- Composición del modelo, si posee subsistemas los cuales pueden ser analizados más fácilmente.

### **2.6.3 Formulación de un modelo para la FMS**

Un modelo ideal de FMS es aquel que conduzca a un mayor entendimiento de los aspectos fundamentales que permita a su vez la predicción del desempeño del biorreactor deberá incluir las siguientes características (Mitchell y col., 1992):

- Descripción de la distribución de las partículas de sustrato en el biorreactor o de su movimiento si el biorreactor es agitado.
- Descripción de la generación de calor, transferencia de calor y el efecto de la temperatura sobre el crecimiento.
- Descripción de la difusión y transferencia de oxígeno y dióxido de carbono y de los efectos de estos en el crecimiento.
- Descripción de la producción de exoenzimas, degradación de sustrato y difusión y consumo de monómero y la distribución de estos en el sustrato.
- Descripción de la producción de biomasa y su ubicación (es decir, aérea, superficial o penetrativa).
- Descripción de los cambios de pH y actividad de agua y sus localizaciones en el sustrato (en la superficie donde afectan a la biomasa y en el sustrato donde afectan a las enzimas).
- Descripción de los cambios fisiológicos (incluyendo represión de la síntesis de exoenzimas), diferenciación de la biomasa. Este aspecto de cualquier modelo deberá ser empírico o mecanístico muy simple ya que la complejidad del

metabolismo es muy grande. La diferenciación puede ser muy importante en el modelado de la producción de metabolitos secundarios en FMS.

Un modelo de esta forma no ha sido realizado todavía, pero ya se ha tenido algún progreso en el modelado de las partes individuales del mismo.

## **2.7 Estado del arte del modelamiento de los balances de masa y energía en biorreactores de charola**

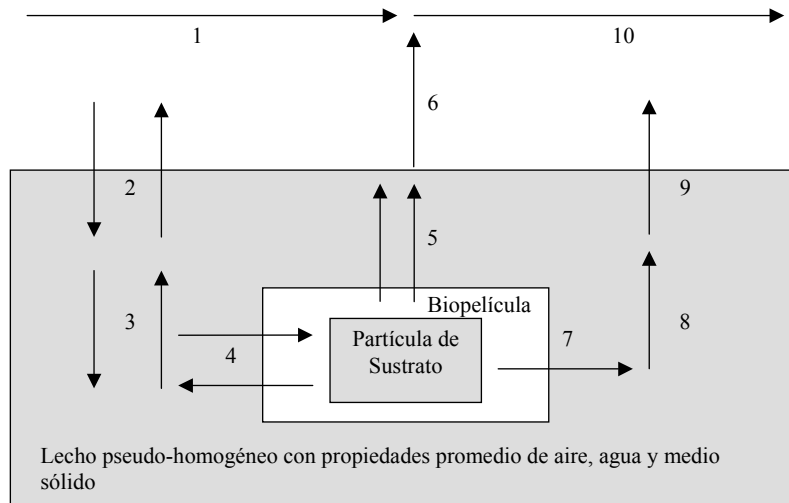
Durante mucho tiempo se ha tenido evidencia cuantitativa de las limitaciones en la transferencia de calor y masa en biorreactores de charolas para FMS. Por ejemplo, Rathbum y Shuler (1983) notaron gradientes de temperatura de  $3^{\circ}\text{C cm}^{-1}$  y gradientes de  $\text{O}_2$  de  $1.7\% (\text{v/v}) \text{cm}^{-1}$  durante la fermentación de tempeh. El trabajo de modelamiento realizado en los últimos 10 años ha mostrado cómo las limitaciones a la transferencia de calor y masa interactúan afectando el desempeño de la charola.

Los procesos de transferencia de calor que ocurren en las charolas se muestran en la Figura 2.2. Esencialmente, la transferencia de calor dentro de la charola se limita a la conducción y la transferencia de masa se limita a la difusión. Hay intercambio en la superficie de la charola entre el lecho y el aire del “headspace”. En los biorreactores de charola varios factores limitan fuertemente el desempeño del mismo, transferencia de calor, transferencia de oxígeno y transferencia de agua.

### **2.7.1 Balances de calor para biorreactores de charola**

La transferencia de calor ha sido identificada como el principal problema en los biorreactores de charola, tanto por estudios experimentales como de modelamiento. Se han observado temperaturas de hasta  $20^{\circ}\text{C}$  por arriba de la temperatura externa de incubación para alturas de lecho tan pequeñas como 8 cm (Ghildyal y col., 1993). Esto ocurre debido a que la remoción de calor es esencialmente limitada a la conducción a través del lecho. Debe notarse que también se presenta convección natural dentro del lecho en respuesta a los perfiles de temperatura, y pueden afectar no solo la transferencia de calor, sino también la transferencia

de CO<sub>2</sub>, oxígeno y vapor de agua (Smits y col., 1999), pero la convección natural no ha recibido suficiente atención experimental o de modelamiento (Mitchell y col., 2003).



**Figura 2.2.** Los fenómenos de transferencia de calor y masa presentes en charolas con fondo sin perforaciones, sin tapa. No todos los modelos consideran todos los pasos. La suposición de una biopelícula en la superficie es más apropiada para el crecimiento de un microorganismo unicelular que para un hongo. (1) Flujo de aire alrededor de la charola, manteniendo las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el “headspace” de la cámara de charolas; (2) Intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> entre los gases del “headspace” y los espacios inter-partícula de las charolas; (3) Difusión de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dentro de los espacios inter-partícula; (4) Transferencia de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> entre los espacios inter-partícula y la biopelícula; (5) Generación de agua metabólica, evaporación en los espacios inter-partícula, remoción de energía a través del calor latente de vaporización, y difusión dentro de los espacios inter-partícula; (6) Transferencia de vapor de agua desde los espacios inter-partícula hacia el “headspace”; (7) Generación de calor metabólico residual; (8) Conducción a través del lecho; (9) Remoción convectiva de calor en la superficie de la charola (10) Flujo de aire, arrastrando calor a través del “headspace” de la cámara de charolas. (Mitchell y col., 2000a, 2000b, 2003).

Szewczyk (1993) modeló el efecto de la remoción de calor convectiva y evaporativa en la superficie del lecho sobre el desempeño de la charola. Asumió que el coeficiente de transferencia de masa por evaporación se relaciona con el coeficiente de transferencia de calor superficie-alrededores por medio de una razón psicrométrica. El valor de este coeficiente puede aumentarse al aumentar el flujo de aire que pasa sobre la superficie de la charola, sin embargo, la relación no fue explorada. Conforme el valor del coeficiente convectivo aumenta, la temperatura estimada de la superficie inicialmente cae claramente, desde valores tan altos como 45 - 60° C con un coeficiente convectivo de 2 Wm<sup>-2</sup>K<sup>-1</sup> hasta valores cercanos a 35° C

con un coeficiente convectivo de  $10 \text{ Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$ . Sin embargo, aumentar el coeficiente convectivo hasta  $50 \text{ Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$  no tiene efecto en reducir más la temperatura de la superficie del lecho.

Rajagopalan y Modak (1994, 1995), propusieron un balance de calor que toma en cuenta la conducción y la producción de calor metabólico:

$$\rho_s C_p \frac{\partial T}{\partial t} = k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q \quad (9)$$

Donde  $\rho_s$ ,  $C_p$ ,  $T$  y  $k_b$  son la densidad, capacidad calorífica, temperatura y conductividad térmica del lecho respectivamente; y  $r_Q$  la tasa metabólica de producción de calor por el microorganismo.

Smits y col. (1999) añadieron un término para describir la remoción de calor por evaporación:

$$\frac{\partial H}{\partial t} = k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q + \lambda D_{VAP}^* \frac{\partial^2 C_{VAP}}{\partial z^2} \quad (10)$$

Donde  $H$  es la entalpía del lecho, la cual es función de la temperatura y  $\lambda$ , el calor latente de vaporización del agua. El último término del lado derecho describe la remoción de calor por evaporación y difusión del agua con el espacio de aire en los poros del lecho, suponiendo que está en equilibrio térmico y de humedad con el sólido. Sin embargo, en el uso típico de los biorreactores de charolas el término de evaporación es poco probable que sea necesario, ya que simulaciones de Smits y col. (1999) mostraron que la contribución de la evaporación al enfriamiento puede despreciarse si las charolas son incubadas en un ambiente con una humedad relativa del 98%.

### 2.7.2 Balances de agua para biorreactores de charola

A la fecha solo el modelo de Smits y col. (1999) describe el balance de agua en el lecho de sustrato dentro de la charola. Este es descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C_w}{\partial t} = r_{H_2O} - \left[ \frac{\partial C_{VAP}}{\partial t} - D^*_{VAP} \frac{\partial^2 C_{VAP}}{\partial z^2} \right] \quad (11)$$

Donde  $C_w$  es la concentración de agua líquida por unidad de volumen del lecho,  $C_{VAP}$  la concentración de vapor de agua por unidad de volumen de lecho,  $D^*_{VAP}$  el coeficiente efectivo de difusión de vapor de agua dentro del lecho y  $r_{H_2O}$  la tasa metabólica de producción de agua. El primer término dentro de los corchetes en el lado derecho de la Ecuación (11) representa la evaporación de agua. La tasa de evaporación de agua depende de la tasa de cambio en la temperatura del lecho, dado que se supone que el aire está en equilibrio con el sólido. El segundo término dentro de estos corchetes representa la difusión de vapor de agua dentro de los espacios vacíos.

### 2.7.3 Ideas clave obtenidas a partir de modelos para biorreactores de charola y necesidades de innovación futura

Rajagopalan y Modak (1994) usaron su modelo para explorar las interacciones entre la altura del lecho y la temperatura del aire en el “headspace”, concluyendo que para tener un adecuado control de temperatura, la estrategia óptima fue usar un lecho delgado, de alrededor de 1 - 3 cm de altura, y una temperatura del aire en el “headspace” cercana a la temperatura óptima de crecimiento.

Las simulaciones de Rajagopalan y Modak (1994) confirman el problema de escalamiento para los biorreactores de charola: el escalamiento no puede lograrse simplemente con aumentar la altura del lecho en la charola ya que esto conduce rápidamente a severos problemas de sobrecalentamiento. El escalamiento sólo puede conseguirse incrementando el



área de las charolas, lo cual solo puede conseguirse, ya sea usando charolas más amplias o simplemente usando más charolas (Mitchell y col., 2000b).

Las limitaciones de la transferencia de calor y masa en charolas para la difusión y la conducción dificulta la capacidad para influenciar las condiciones ambientales dentro del lecho de una charola. Por lo tanto, nuevos trabajos de modelamiento adicional serán de uso limitado en la optimización adicional del diseño y operación de las charolas individuales. Sin embargo, la cuestión del flujo de aire dentro del “headspace” del biorreactor merece atención. Además, para un mejor entendimiento de las charolas, podría realizarse trabajo experimental y de modelamiento para evaluar la importancia de la convección natural dentro del lecho, lo cual puede ocurrir debido a los gradientes de temperatura que surgen (Mitchell y col., 2003).

#### **2.7.4 Estrategias para la remoción de calor en biorreactores de charola**

Se conocen diversos estudios sobre la transferencia de calor y masa ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y agua) en biorreactores de lecho empacado o columnas (Mitchell y col., 2003) y más recientemente ha surgido un gran interés por los biorreactores agitados (Mitchell y col., 2003). Sin embargo, aunque los biorreactores de charola han sido empleados desde hace mucho tiempo (Pandey y col., 2001) y que son considerados el tipo más simple de biorreactor para FMS (Durand, 2003; Mitchell y col., 1992), existen pocos estudios relacionados a la transferencia de calor y masa en éstos. Probablemente la idea que se tiene acerca de la antigüedad y simplicidad de este tipo de biorreactores limita la capacidad para su innovación y análisis.

Aunque la disposición de material de fermentación en una charola es en realidad un lecho empacado, la principal diferencia es el paso de aireación forzada a través del lecho empacado, es decir, en un biorreactor de lecho empacado es posible conocer y controlar la magnitud del flujo de aire que atraviesa el lecho de fermentación. Esto no es posible y hace difícil el análisis de los fenómenos de transporte en un biorreactor de charolas, por lo que es necesario llevar a cabo algunas simplificaciones y estimaciones para analizar la transferencia de calor y masa en estos biorreactores.

Así como se han hecho pocos estudios de los procesos de transferencia de calor y masa en biorreactores de charola, también se han desarrollado pocas estrategias para la remoción de calor metabólico del lecho de fermentación. Recientemente se estudió la aplicación de superficies de enfriamiento y se desarrolló un modelo matemático para estudiar la transferencia de masa y energía (Khanahmadi y col., 2004). Lo anterior requiere la construcción de nuevos biorreactores para los procesos de FMS. También se ha reportado el uso de cambios dinámicos de aire, incluyendo pulsaciones de presión de aire y circulación interna de aire, para evaluar su efecto en la transferencia de calor, sin embargo no se desarrollaron balances de masa y energía (Chen y col., 2002, 2005; Xu y col., 2002).

Sin embargo, hasta ahora el efecto del número de Reynolds ( $N_{Re}$ ) como función del flujo interno de aire en el “headspace” del biorreactor, sobre la transferencia de calor y masa no ha recibido suficiente atención. Uno de los mayores retos de los procesos de FMS continúa siendo la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa desde el lecho de fermentación hacia el aire en el “headspace” del biorreactor. Estos coeficientes de transferencia son fundamentales en los modelos matemáticos.

## **2.8 Soportes empleados en FMS**

En FMS los materiales empleados como soportes son fibrosos, lo que ocasiona que muestren espacios vacíos entre las partículas, estos espacios los llena fase gaseosa (Gervais y col., 1996; Gervais y Bensoussan, 1994; Raimbault, 1998). En estos medios, el crecimiento está limitado por la difusión de nutrientes, la cual ocurre solamente en la delgada capa de agua que rodea al microorganismo; el crecimiento puede limitarse por altas concentraciones de metabolitos en esta capa acuosa (Nakadai y Nasuno, 1988; Gervais y Bensoussan, 1994). Los soportes empleados en FMS son insolubles en agua y actúan como fuente de carbono, nitrógeno y de minerales (Pandey y col., 1999). Los soportes tienen la capacidad de absorber el agua necesaria para las actividades metabólicas. Las bacterias y levaduras crecen adheridas a la superficie del soporte, los hongos filamentosos en cambio son capaces de penetrar el soporte para asimilar los nutrientes, en este caso el soporte también sirve como superficie de anclaje (Pandey y col., 1999). Así mismo, el tipo de soporte y el pretratamiento del mismo

influyen considerablemente sobre la FMS (Pandey y col., 1999; Hoogschagen y col., 2001). Los soportes empleados en FMS se pueden clasificar en dos grandes categorías:

- Materiales orgánicos que son moléculas poliméricas insolubles o parcialmente solubles en agua, y que sirven al mismo tiempo como soporte y sustrato (soporte-sustrato). Estos materiales son generalmente productos agro-industriales.
- Materiales nutricionalmente inertes, su función es sólo como soporte (soporte inerte) y deben de impregnarse con medios de cultivo (Durand y col., 1996).

El primero y más comúnmente usado involucra el cultivo de microorganismos sobre una matriz polimérica que es asimilable por el microorganismo, la naturaleza del polímero puede ser de almidón, celulosa o lignina, el segundo tipo involucra el desarrollo del microorganismo sobre un soporte poroso inerte impregnado con medio de cultivo de composición definida, los materiales empleados en este tipo de cultivos son: espuma de poliuretano, vermiculita, agrolita, poliestireno, etc. (Larroche, 1996; Auria y col., 1995; Gautam y col., 2002).

El sustrato ideal es aquel que provee todos los nutrientes necesarios para el óptimo funcionamiento de los microorganismos (Selvakumar y col., 1996), sin embargo, alguno de los nutrientes puede estar disponible en cantidades sub-óptimas o bien estar ausentes en el sustrato, en tal caso es necesario agregarlo de manera externa (Pandey y col., 1999). El costo y disponibilidad del soporte es otra importante consideración. En algunos casos, la extensión de los tratamientos físicos o químicos necesarios para mejorar la accesibilidad del microorganismo a los nutrientes y los cambios fisicoquímicos que ocurren después de la esterilización del sustrato determinan si éste es adecuado para emplearse en FMS. Otro factor crítico que influye en FMS es el tamaño de partícula del soporte (Selvakumar y col., 1996).

Entre los diferentes factores importantes para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas con un sustrato en particular los más críticos son el tamaño de partícula, el contenido de humedad y  $a_w$ . Generalmente, las partículas pequeñas proveen un área superficial mayor para el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, las partículas

de sustrato excesivamente pequeñas se pueden aglutinar, lo que puede interferir con la aireación y con la respiración del microorganismo dando como resultado un crecimiento deficiente. En contraste, partículas grandes permiten que los microorganismos tengan una aireación mayor, por el aumento en los espacios inter-particulares, pero proporcionan una superficie limitada para el crecimiento microbiano. Una manera de mejorar la relación área-volumen es mediante el uso de materiales con un tamaño de partícula reducido, que puedan proporcionar un medio con una geometría definida (Pandey y col., 1999).

### **2.8.1 Residuos agro-industriales como soporte-sustrato**

Los residuos agro-industriales son los soportes-sustrato más utilizados en FMS (Pandey y col., 1999). La selección de los sustratos es crítica y repercute sobre el éxito de la FMS, esta selección involucra la búsqueda de materiales agrícolas adecuados para el crecimiento microbiano. Además, la formación del producto de interés depende de la disponibilidad del sustrato, su composición y del tipo de microorganismo y productos de interés. El pre-tratamiento del sustrato (mecánico o químico) se realiza para facilitar el crecimiento microbiano y puede incluir cocción al vapor, inmersión en agua, molido, tamizado y tratamientos con álcali o ácido. Algunas veces se enriquece el sustrato con vitaminas y oligoelementos (Pandey y col., 1999).

Este tipo de sustratos sólidos son procesados de manera parcial y son estructural y nutricionalmente complejos, con lo que la caracterización del soporte es prácticamente imposible y también puede interferir con la reproducibilidad del proceso. La presencia de mezclas de componentes de alto y bajo peso molecular, puede ocasionar patrones complejos de inducción, represión e inhibición en la regulación del metabolismo microbiano.

La estructura básica de los soportes-sustratos consiste en macromoléculas que sirven también como fuente de carbono y energía, la asimilación de estas macromoléculas requiere la síntesis y excreción de enzimas por parte de los microorganismos. La naturaleza de este tipo de sustratos tiene como consecuencias:

- a. La masa del sustrato no está uniformemente distribuida en el espacio, pero contiene espacios vacíos entre las partículas que se pueden llenar con una fase gaseosa o líquida, esto ocasiona que no se puedan realizar algunas determinaciones, como por ejemplo la determinación del pH.
- b. El manejo de los sólidos requiere equipo especializado. La dinámica de los sólidos es compleja y poco entendida. La mezcla de los sólidos durante la fermentación requiere el diseño de biorreactores y agitadores especiales, para prevenir la compactación del soporte.
- c. El crecimiento microbiano está restringido a la superficie del soporte por la disponibilidad de oxígeno debido a que los soportes limitan la transferencia de oxígeno. El efecto del microorganismo se limita a la superficie del soporte, lo que ocasiona la formación de gradientes de sustratos, productos, pH, etc. (Mitchell y Lonsane, 1992).

### **2.8.2 Soportes inertes**

El uso de materiales nutricionalmente inertes en FMS facilita un adecuado diseño de medios de cultivo, monitoreo de los parámetros del proceso, diseño de estrategias de escalamiento y varios aspectos de ingeniería, que son difíciles o casi imposibles de medir cuando se emplean sustratos orgánicos (soporte-sustrato) en una FMS. Los materiales inertes impregnados con un medio de cultivo adecuado proporcionan condiciones aerobias homogéneas en el biorreactor y no contribuyen con impurezas al producto final (Gautam y col., 2002). Los soportes inertes tienen una estructura física más o menos constante durante los procesos, permitiendo un mejor control de la transferencia de calor y masa.

Una ventaja adicional del uso de soportes inertes comparado con los soportes-sustratos es la recuperación menos complicada del producto. Los productos extracelulares de interés pueden ser fácilmente extraídos desde el soporte inerte, y por lo tanto los productos pueden ser obtenidos con pocas impurezas comparadas con los soportes-sustratos, además en algunos casos el soporte inerte puede volver a ser usado.

Otra ventaja del uso de soportes inertes es la facilidad de realizar balances de masa debido a que todas las concentraciones de nutrientes en el medio de producción son conocidas y pueden ser analizadas, por lo que se puede estudiar el efecto de determinado componente del medio de cultivo.

El uso de soportes inertes impregnados de medio líquido ofrece una flexibilidad adicional cuando se diseñan medios para la producción óptima de metabolitos, enzimas y esporas. Además, cuando se usa un medio definido químicamente, pueden ser estudiados en detalle los efectos de ciertos componentes del medio sobre la fisiología y la cinética de crecimiento del microorganismo, y sobre la producción de metabolitos, enzimas y esporas.

Los soportes inertes impregnados con medio definido, son una herramienta valiosa de investigación y pueden ser importantes en algunos procesos industriales ya que tienen algunas ventajas que no presentan los soportes-sustrato.

Los soportes inertes más utilizados en FMS incluyen espuma de poliuretano, poliestireno, amberlita, vermiculita, agrolita, perlas de vidrio y bagazo de caña (Ooijkaas y col., 2000).

## ***2.9 Aspergillus niger***

Todos los hongos se encuentran contenidos en el Phylum mycota. Su clasificación se fundamenta en las características de sus esporas sexuales y cuerpos fructíferos presentes en sus ciclos biológicos. Aunque muchos hongos sólo producen esporas sexuales y cuerpos fructíferos bajo ciertas condiciones del medio, existen otros que no los producen. Así los ciclos de vida completos o perfectos de muchos hongos no se conocen. En consecuencia los hongos descritos como imperfectos se clasifican con base en características diferentes en los estadios sexuales. Este tipo de hongos (imperfectos) se ha colocado provisionalmente en una clase especial llamada Deuteromycetes (Smith y Pateman, 1977).

El género *Aspergillus* pertenece a los deuteromycetes. Sus hifas vegetativas tabicadas crecen en el sustrato o por encima del mismo. La célula se ramifica en intervalos y extiende al

aire las hifas o conidióforos fecundos cuyo extremo aumenta de tamaño para formar vesículas en donde están dispuestos de manera radial numerosos esterigmas. Cada uno de ellos sustenta una cadena de conidios (Samson, 1992, 1994).

*Aspergillus niger* tiene conidióforos lisos y pigmentados debajo de la vesícula, vesícula esférica, generalmente de color negro, méntula presente o ausente frecuentemente pigmentada, cabeza conidial típicamente radiada, conidios negros (Smith y Pateman, 1977; Samson, 1994).

Las especies de *Aspergillus* pertenecen a los primeros organismos que fueron cultivados en un medio sintético, para estudiar sus propiedades bioquímicas (Samson, 1994). El género *Aspergillus* ha sido reconocido como componente fúngico de nuestro ambiente, crece en una gran variedad de sustratos bajo diferentes condiciones ambientales. Se localiza en suelos, granos almacenados, vegetales en descomposición entre otros sustratos (Samson, 1994; Arora y col., 1991; Klich y Bennet, 1992).

Las especies de *Aspergillus* son de las más comunes en el ambiente humano. Algunas son patógenas para el hombre o animales y producen metabolitos secundarios dañinos como aflatoxinas que contaminan alimentos, otras son de importancia industrial (Decker y col., 2000; Samson, 1994). Abundan en regiones tropicales y subtropicales. Junto con el género *Penicillium*, son los géneros dominantes en productos almacenados (Kozakiewicz y Smith, 1994).

### **2.9.1 Factores que influyen sobre el crecimiento y metabolismo de *A. niger***

Por ser un hongo filamentoso su crecimiento y metabolismo se ven influenciados por factores externos como temperatura, pH, contenido de humedad y composición de la atmósfera gaseosa. La actividad de agua puede afectar la germinación de diferentes maneras: i) la duración de la fase lag después de la germinación, ii) la velocidad de extensión del tubo germinal. El valor mínimo de actividad de agua para el crecimiento de *A. niger* se encuentra en el intervalo de 0.74 - 0.85, y su valor óptimo es de 0.98. Por otro lado, la mayoría de los hongos son mesófilos, crecen en temperaturas que oscilan entre los 10 y 40° C. El género

*Aspergillus* típicamente crece bien entre los 15 y 30 °C, sin embargo, algunas especies crecen fuera de este intervalo. Para *A. niger* el intervalo de temperatura para su crecimiento está entre 9 y 60° C, con un óptimo en el intervalo de 17 a 42° C. También los hongos filamentosos son capaces de crecer en un intervalo amplio de pH (4 - 8). Así mismo en FMS es difícil controlar el pH debido a que el crecimiento fúngico ocasiona cambios en él, estos cambios pueden afectar marcadamente los procesos metabólicos por la modificación en los límites de actividad de agua, a la cual ocurre el crecimiento y germinación. *A. niger* puede crecer en un intervalo de pH de 1.5 a 9.8. En cuanto a la composición de la atmósfera gaseosa, las especies de *Aspergillus* pueden ser alteradas en su crecimiento por cambios en las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Para que la germinación y el crecimiento micelial cesen, se deben incrementar los niveles de CO<sub>2</sub> y reducir los de O<sub>2</sub>, sin embargo este efecto es más marcado si los niveles de actividad de agua y temperatura también interactúan (Kozakiewicz y Smith, 1994).

### **2.9.2 Productos industriales del género *Aspergillus***

Los principales productos que se pueden obtener a partir del género *Aspergillus* son:

- Alimentos fermentados.
- Koji.
- Proteína unicelular.
- Ácido cítrico, glucónico, itacónico y kójico.
- Micotoxinas (aflatoxinas).
- Enzimas entre las que destacan: amilasas, ligninasas, proteasas, pectinasas, lipasas, glucoamilasa etc. (Kozakiewicz y Smith, 1994).

En los países asiáticos se ha usado en fermentaciones de alimentos. Por cientos de años *A. niger*, también se ha empleado subsecuentemente en la producción biotecnológica de ácidos orgánicos. En adición, este hongo se ha estudiado en función de su habilidad para producir



enzimas extracelulares como pectinasas o celulasas que pueden utilizarse en la industria de los alimentos (Decker y col., 2000).

## **2.10 Producción de fitasa por FMS**

La producción comercial de fitasa por cepas de *A. niger* se realiza de manera tradicional con diversos sustratos formulados con subproductos agro-industriales, a través de cultivos de tipo sumergido y más recientemente por FMS (Roopesh y col., 2006).

Aunque la fitasa la producen plantas, animales y microorganismos, las fuentes microbianas, son promisorias para su explotación comercial. Cepas de *Aspegillus* sp., principalmente *A. ficuum* y *A. niger* han sido más comúnmente empleadas para propósitos industriales. Además, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* y *Mucor racemosus* han sido también estudiados para la producción de fitasa.

Estudios recientes sugieren que residuos agro-industriales tales como torta de aceite de sésamo, torta de aceite de coco, torta de aceite de cacahuate y la torta de aceite de soya son adecuados como sustrato único o en combinación para la producción de fitasa por FMS.

### **2.10.1 Ácido fítico**

El ácido fítico, mio-inositol hexafosfato, es la principal forma de almacenamiento de fosfato orgánico en cereales y leguminosas. Los cereales y las semillas de leguminosas contienen cantidades considerables de ácido fítico (más del 1%), cuya principal función es almacenar fósforo como fuente de energía para la planta (Raboy, 2003). Es un componente no deseable en productos alimenticios derivados de plantas debido a: (1) es una fuente de fosfato pobremente digerida por animales monogástricos y (2) se enlaza con minerales esenciales tales como zinc, hierro, calcio y magnesio lo que reduce la absorción de estos elementos en el intestino (Reddy y col., 1982).

La interacción del ácido fítico con proteínas, vitaminas, y minerales es considerada como uno de los principales factores que limitan el valor nutritivo de cereales y leguminosas

(Han y Wilfred, 1988). Por ejemplo, dos terceras partes del fósforo contenido en granos de soya esta enlazado con el ácido fítico y es indigerible por animales monogástricos.

Además, el incremento en el uso de materiales basados en soya como alimento humano y el posible efecto de los fitatos en la biodisponibilidad de minerales ha estimulado el interés en la reducción o eliminación de fitatos.

Los fitatos insolubles en agua están estrechamente asociados a las proteínas, especialmente en semillas oleaginosas y reducen la biodisponibilidad de las proteínas con grupos básicos en sus aminoácidos. La alimentación de animales monogástricos con fitasa microbiana en su dieta, modifica los complejos con el fitato e incrementa la biodisponibilidad del fósforo (Nelson y col., 1971), calcio (Nelson y col., 1968) y proteínas (Rojas y Scott, 1968).

El interés en disminuir las propiedades antinutricionales del ácido fítico, ha estimulado estudios para desarrollar métodos económicos para su hidrólisis.

Para remover el ácido fítico existen métodos como la molienda o el triturado del cereal. El remojo y la germinación de las semillas, así como los procesos de fermentación han demostrado ser los métodos más eficaces para la degradación de los fitatos presentes en las semillas y cereales. Sin embargo, el modo más frecuente para eliminar el ácido fítico, es la adición de una enzima exógena llamada fitasa, la cual ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para su empleo en la alimentación de aves y cerdos. La hidrólisis de fitatos previa al consumo incrementará la disponibilidad del inositol y del fosfato inorgánico en los alimentos.

### **2.10.2 Fitasa**

La enzima fitasa se encuentra de manera natural en el tracto digestivo de algunos animales, en plantas y también es producida por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. *Aspergillus*, es el género de hongos filamentosos que produce la fitasa extracelular más activa y por ello es el microorganismo más empleado en la producción industrial de esta

enzima (Brenes y col., 2002). Varias especies de plantas y microorganismo producen fitasa (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8) la cual hidroliza el ácido fítico a fosfato inorgánico e inositol mono- y penta-fosfato. Shieh y Ware (1968) buscaron microorganismos que produjeran fitasa y encontraron que *Aspergillus ficuum* NRRL3135 produce la mayor cantidad de fitasa. La enzima de esta cepa fue purificada hasta la homogeneidad y fueron determinadas sus propiedades fisicoquímicas (Ullah y Gibson, 1987).

También se han hecho determinaciones de la composición de aminoácido y azúcares de la fitasa de *A. ficuum* así como la secuencia de aminoácidos de varios péptidos derivados de la enzima (Ullah, 1988). La fitasa es una de las tres fosfatasas ácidas extracelulares producidas por *A. ficuum* (Shieh y col., 1969). La fitasa, y otras dos fosfatasas ácidas no específicas con pH óptimo de 2.5 y 6.0 han sido identificadas y caracterizadas (Ullah y Cummins, 1987, 1988). *Aspergillus ficuum* fue localizado en el grupo taxonómico de *Aspergillus niger* (Wodzinski y Ullah, 1996). Sin embargo, posteriores estudios de ADN sugirieron que *Aspergillus ficuum* no era un especie válida, por lo que se conservó la designación de *Aspergillus niger* (Frisvad y col., 1990; Peterson, 1992).

La fitasa es una enzima que se aplica en varios procesos, como tratamientos de frijol de soya y en harinas de semillas de algodón para alimentación animal, incluyendo la reducción del ácido fítico en leche de soya formuladas para infantes (Gibson, 1987).

### **2.11 Producción de invertasa por FMS**

La cinética de producción de invertasa por hongos filamentosos en fermentación sumergida, se ha estudiado extensamente, sin embargo, hay pocos reportes comparativos de la producción de invertasa en FMS y FML (Romero-Gómez y col., 2000; Ashok y col., 2001). Se ha estudiado la invertasa fúngica inmovilizada en varios tipos de biorreactores para la producción de mezclas comerciales de azúcares provenientes de sustratos agrícolas (Arora y col., 1991). Favela-Torres y col. (1997), determinaron las cinéticas de crecimiento para una cepa de *Aspergillus niger* en tres sistemas de cultivo diferentes, cajas Petri, FML y FMS, utilizando en ésta última un soporte inerte, empleando concentraciones elevadas de glucosa

como fuente de carbono. También demostraron que en FMS el crecimiento de este microorganismo se veía favorecido por el incremento de fuente de carbono en el medio. Romero-Gómez y col. (2000), demostraron que la producción de invertasa es mayor en un sistema de FMS con espuma de poliuretano como soporte inerte, en comparación con la FML, empleando elevadas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo.

### **2.11.1 Invertasa**

El nombre oficial de la invertasa es S-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26). Esto implica que la reacción catalizada por esta enzima es la hidrólisis de residuos terminales no reductores fructofuranosidos de  $\beta$ -fructofuranosidos. Esta reacción es compartida por la  $\alpha$ -D-glucosidasa, además la sacarosa puede hidrolizarse en medio ácido sin intervención de la invertasa.

La invertasa se utiliza principalmente en la industria de alimentos (confitería) donde la fructosa es preferible a la glucosa y no cristaliza tan fácil. Sin embargo, el uso de la invertasa es limitado debido a que la glucosa isomerasa puede ser utilizada para convertir directamente la glucosa en fructosa a un costo más bajo (Rubio y Maldonado, 1995). La enzima también se usa en la fabricación de edulcorantes artificiales, en la industria farmacéutica (L'Hocine y col., 2000) en la obtención de fructooligosacáridos (Chen y Liu, 1996; Nguyen y col., 1999). Para el uso de la invertasa en alimentos se requiere de una proteína altamente purificada, a fin de no alterar el sabor y preservar la salud de los consumidores. La invertasa es producida por una amplia variedad de organismos que pueden usar la sacarosa como fuente de carbono. En el ámbito comercial la invertasa se produce por cepas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlbergensis* (Carlson, 1987).

La invertasa es una enzima que es producida por plantas y microorganismos, en los últimos años esta enzima ha recibido mucha atención como un buen modelo para el estudio de enzimas glucosiladas secretadas por levaduras y hongos filamentosos que tienen como inductores de la síntesis de esta enzima a los azúcares sacarosa y rafinosa, los cuales también funcionan como sustratos para la invertasa extracelular de *Aspergillus niger* (Mukherjee y Sengupta, 1985; Quiroga y col., 1995, Pérez y col., 1996).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la generación de calor metabólico y a la baja conductividad térmica de los sustratos empleados, los procesos de FMS se caracterizan por la presencia de altos gradientes de temperatura y humedad en el medio de cultivo. Estos gradientes tienen un gran impacto en el crecimiento de microorganismos así como en la producción de enzimas.

Lo anterior hace necesario el desarrollo de estrategias que permitan el control tanto de la temperatura como de la humedad. Hasta el momento se han desarrollado pocas estrategias que permitan la remoción del calor metabólico en biorreactores de charolas.

Por otro lado, uno de los principales retos en FMS continúa siendo la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa desde el lecho de fermentación hacia el aire en el “headspace” del biorreactor de charolas para FMS. Estos coeficientes de transferencia son requeridos en los modelos matemáticos. En nuestro conocimiento, no están disponibles reportes científicos que presenten estudios que conduzcan a la estimación de coeficientes de transferencia de calor en biorreactores de charolas para FMS.

En procesos de FMS en residuos agro-industriales (soportes-sustrato) debido al consumo del mismo por parte de los microorganismos es difícil medir algunas variables como la producción de biomasa y consumo de sustrato. Además las propiedades termodinámicas del lecho de fermentación varían con el crecimiento del microorganismo y los cambios en la composición soporte-sustrato. Los soportes inertes se consideran buenos sistemas modelos que permiten la medición de muchas variables (producción de biomasa, consumo de sustrato, etc.) y sus propiedades termodinámicas permanecen constantes. La medición de estas variables es necesaria en el desarrollo de los balances de calor y masa.

Debido a las escasas estrategias reportadas para la remoción de calor en biorreactores de charolas para FMS. Este trabajo busca proponer una estrategia sencilla y económica que permita la remoción de calor del lecho de fermentación en este tipo de biorreactores. Además

se busca contribuir en el desarrollo de modelos matemáticos que sirvan como herramientas para el diseño y optimización de procesos de FMS en biorreactores de charolas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Desarrollar un balance de calor y masa (agua) para estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua), con el propósito de construir un modelo matemático para la estimación de los perfiles de temperatura y contenido de humedad en el lecho de fermentación a fin de evaluar el efecto de variables de operación en un biorreactor de charolas para FMS.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Calcular las propiedades termodinámicas ( $C_p$ ,  $\rho$ ,  $k$ ) del lecho de fermentación, usando un soporte-sustrato (salvado de trigo y harina de soya) y un soporte inerte (agrolita) en el reactor de charolas.
2. Proponer la biorreacción de crecimiento microbiano y hacer el balance estequiométrico que permita conocer los coeficientes de rendimiento entre la producción de dióxido de carbono y la generación de biomasa, producción de agua metabólica y consumo de sustrato, tanto en la fermentación en soporte-sustrato como en soporte inerte.
3. Desarrollar balances integrales de calor y agua en el lecho de fermentación durante el proceso de FMS, que permitan determinar la contribución de los diferentes mecanismos de transferencia en la remoción del calor metabólico así como estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua), bajo diferentes condiciones de operación.

4. Desarrollar y validar un modelo matemático que permita predecir los perfiles de temperatura y contenido de humedad en el lecho de fermentación, bajo diferentes condiciones de operación en la FMS en soporte-sustrato y soporte inerte.
  
5. Proponer y evaluar una estrategia (variable de operación) para la remoción del calor metabólico que no afecte significativamente el contenido de humedad del lecho de fermentación.
  
6. Evaluar el efecto de las variables de operación sobre la acumulación de calor en el lecho de fermentación y sobre el crecimiento del microorganismo, a través de la producción de CO<sub>2</sub>, la producción de biomasa, el consumo de sustrato y la actividad enzimática para la FMS en soporte-sustrato y soporte inerte.



## 5 MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPO EMPLEADO

En esta sección se presentan los materiales, equipos, métodos de medición y técnicas de análisis empleados durante el desarrollo experimental de la tesis. Con el propósito de cumplir con los objetivos planteados (ver sección 4) se propone la siguiente estrategia experimental.

En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestran los diagramas de flujo de los procedimientos generales llevados a cabo para los experimentos en soporte inerte (agrolita) y en residuo agro-industrial (salvado de trigo y harina de soya). Señalándose las variables que fueron medidas y empleadas en el desarrollo de los balances de calor y masa (agua) propuestos.

### **Estrategia experimental**

Brevemente se explica a continuación el alcance de cada uno de los objetivos planteados. El primer objetivo fue planteado a fin de estimar variables termodinámicas concernientes al soporte-sustrato y al soporte inerte necesarias en la formulación de los balances de calor y masa (agua). Estas variables fueron calculadas a partir de metodologías reportadas en la bibliografía empleando la composición de los medios de fermentación utilizados. El segundo objetivo se planteó con la finalidad de obtener los coeficientes de rendimiento de las biorreacciones propuestas para ser empleados en los balances de calor y masa (agua) desarrollados en este trabajo. El balance estequiométrico para los estudios en soporte-sustrato fue resuelto algebraicamente a partir de balances elementales, en el caso del soporte inerte el balance estequiométrico requirió de la medición de la concentración de biomasa y de sustrato a fin de definir los balances elementales. En ambos casos se obtuvieron balance estequiométrico bien definidos. En el tercer objetivo se plantearon balances integrales de calor y masa (agua) para estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) evaluando el efecto de las variables de operación en el lecho de fermentación sobre dichos coeficientes para lo cual se midió la temperatura, producción de  $\text{CO}_2$  y contenido de agua del lecho de fermentación. Habiendo cumplido con los tres objetivos anteriores se tuvieron los elementos necesarios para cumplir con el cuarto objetivo que fue el desarrollo de un modelo

matemático el cual quedó definido con las variables estimadas y medidas en los 3 objetivos anteriores. Además, la validación del modelo matemático propuesto se realizó comparando las predicciones de los perfiles de temperatura y contenido de humedad del modelo, con los valores experimentales obtenidos durante las fermentaciones. En el objetivo 5 se propuso la circulación interna forzada de aire en el “headspace” del biorreactor definida, por el  $N_{Re}$  que fue efectuada con la instalación de un sistema de ventiladores al interior del biorreactor, evaluando su efecto en la remoción de calor a partir de medir la temperatura, el contenido de humedad del lecho de fermentación, producción de  $CO_2$  y las actividades enzimáticas de la invertasa en soporte inerte y de la fitasa en soporte-sustrato. Por último el objetivo 6 referente al efecto de las variables de operación (altura del lecho y  $N_{Re}$ ) se cumplió al alcanzar los objetivos antes mencionados.

A continuación se describen los materiales, métodos y equipos utilizados en el desarrollo experimental de este trabajo.

## **5.1 Microorganismos**

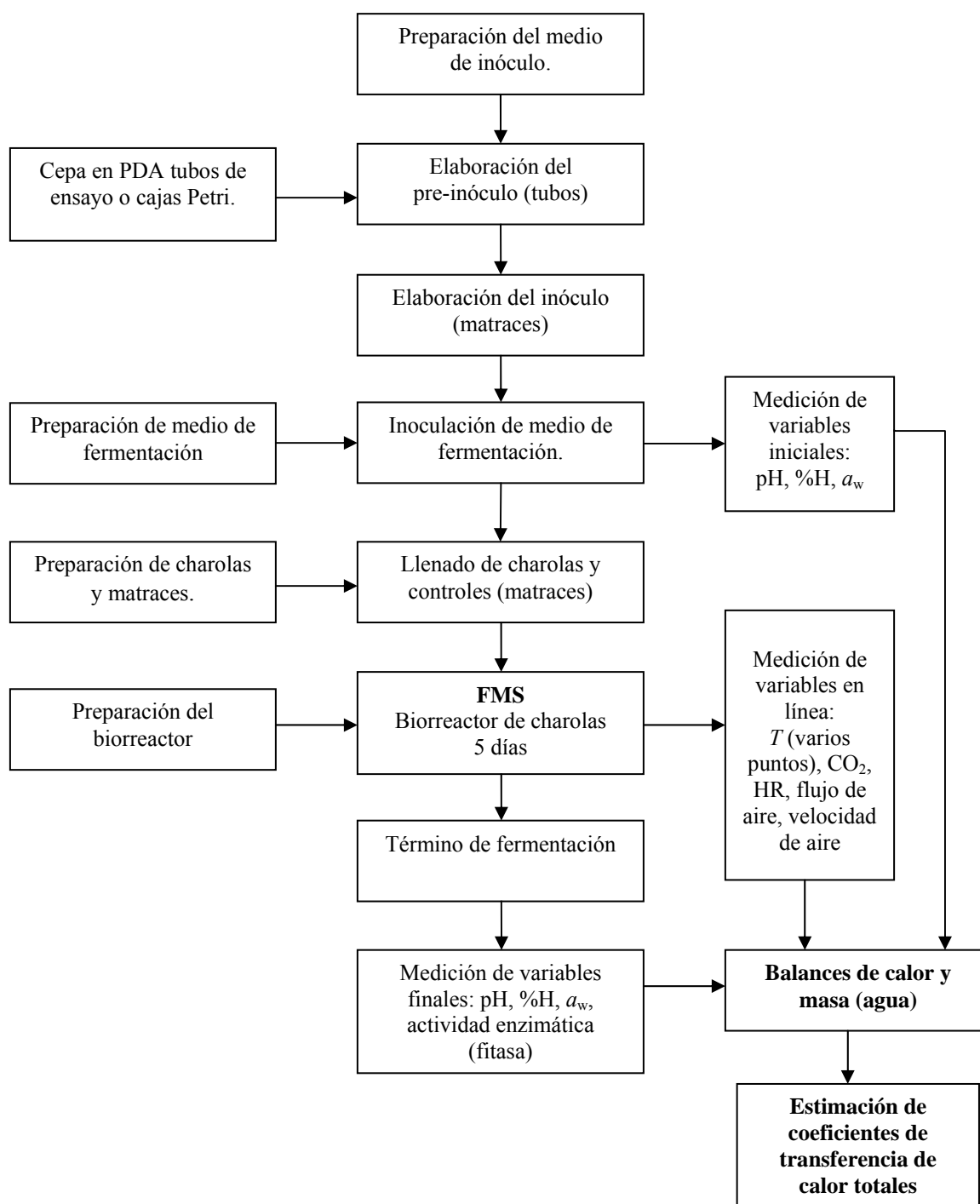
Para los experimentos realizados se usaron dos cepas de *Aspergillus niger*, una para cada tipo de soporte empleado.

### **5.1.1 Microorganismo usado en el residuo agro-industrial**

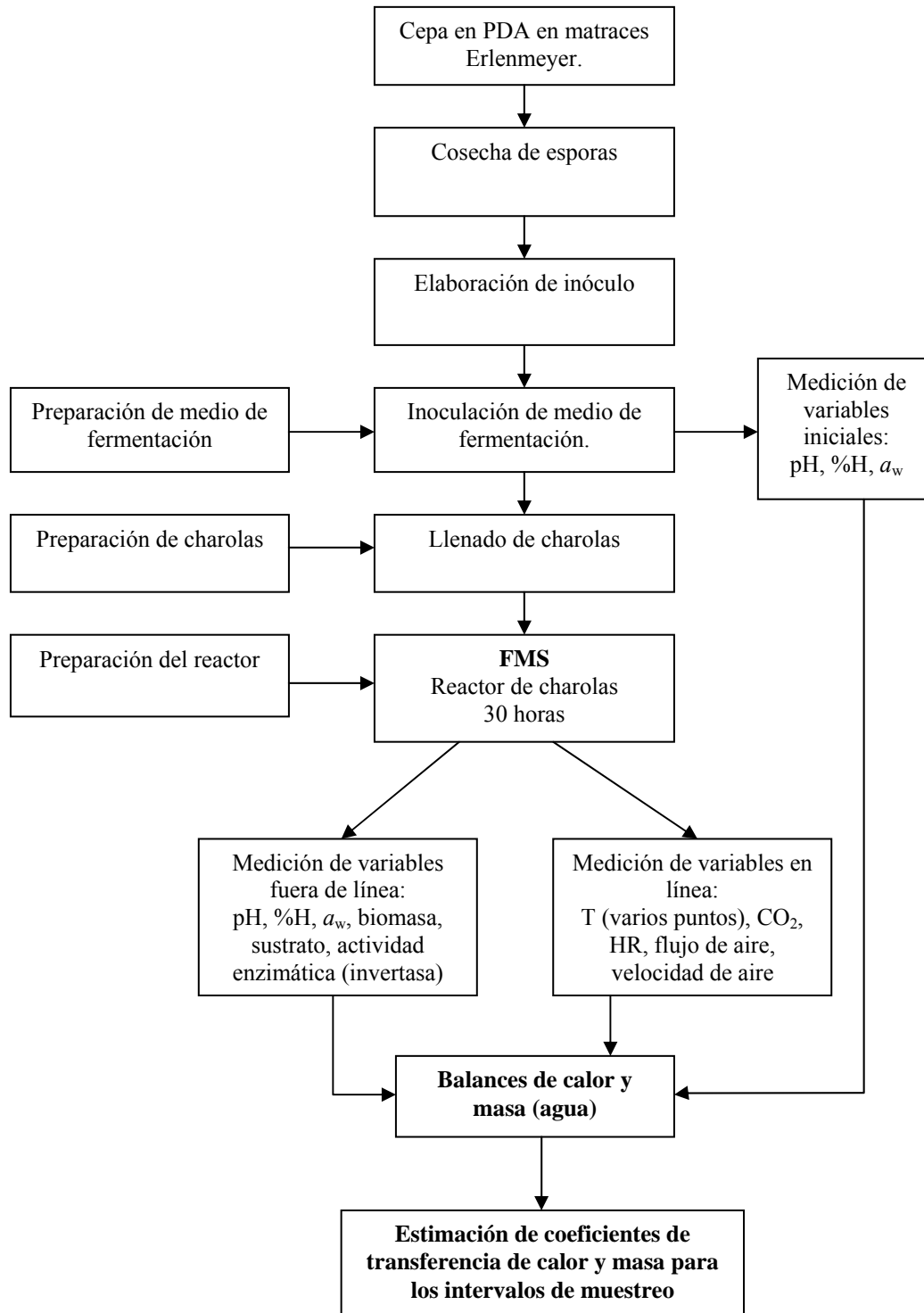
Se empleó una cepa de *Aspergillus niger* AT proporcionada por Alltech de México S.A. de C.V. La cepa empleada es considerada como cepa de tipo GRAS (Generally Recognized As Safe) es decir que bajo las condiciones de fermentación no produce toxinas y que los productos de fermentación que genera pueden ser utilizados como alimento. La cepa fue mantenida mediante resiembra en medio PDA se incubó a 30° C durante un periodo máximo de 5 días.

#### **5.1.1.1 Conservación y propagación de la cepa**

Se tomaron dos segmentos de micelio esporulado de *Aspergillus niger* AT, se colocaron en un tubo de ensayo con 5 mL de solución de Tween 80 estéril (50 mL de agua y 0.1 mL de Tween 80), se agitó, se tomó 1mL por caja Petri, se vació el agar al 3.9 % de PDA, se incubó durante tres días en ambiente humidificado. Se separaron las colonias individuales y se colocaron en tubos inclinados con agar al 3.9 % de PDA.



**Figura 5.1** Diagrama de flujo con el procedimiento general seguido en la realización de los experimentos con soporte-sustrato (salvado de trigo y harina de soya).



**Figura 5.2.** Diagrama de flujo con el procedimiento general seguido en la realización de los experimentos con soporte inerte (agrolita).

### 5.1.1.2 Preparación de medio de inóculo

La composición del medio de cultivo para la preparación del inóculo se muestra en la Tabla 5.1. La cantidad de medio de inóculo preparado depende de la cantidad de medio de fermentación que se va a preparar siendo esta un 30% del contenido de agua total requerida en la fermentación.

**Tabla 5.1.** Composición del medio de inóculo.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (% p/v)</b>	<b>g en 500 mL</b>
Almidón	2.80	14.0
Peptona de caseína	1.80	9.0
KCl	0.05	0.25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15	0.75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10	0.50
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.20	1.0
pH sin ajustar		

Para el pre-inóculo, en tubos, se agregó 0.2 g de salvado de trigo y 10 mL del medio anterior a cada tubo de ensayo (4 tubos). Para el inóculo, en matraz Erlenmeyer se agregó 2 g de salvado de trigo y 100 mL del medio descrito anteriormente.

### 5.1.1.3 Preparación del pre-inóculo

Los tubos que contenían 10 mL del medio de inóculo y 0.2 g de salvado de trigo fueron inoculados bajo condiciones estériles, cada uno con un pedazo de micelio de aproximadamente 5 mm × 5 mm, tomado a partir de la cepa en medio PDA en cajas Petri o tubo inclinado. Los tubos se incubaron inclinados a 30° C y 200 rpm de agitación durante 3 días.

### 5.1.1.4 Preparación del inóculo

Después del periodo de incubación y una vez que visualmente se verificó el crecimiento del microorganismo, se vació el contenido de cada tubo en cada matraz

Erlenmeyer que contenía el medio gelatinizado. Se transfirió el contenido de los tubos descritos anteriormente a los matraces que contenían 100 mL de medio de inóculo y 2 g de salvado de trigo, se incubaron a 30° C y 200 rpm de agitación durante 3 días.

### **5.1.2 Microorganismo usado en los estudios con soporte inerte**

Se empleó la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 conservada en sílica gel (Loera y col., 1999). Esta cepa ha sido reportada en estudios previos de producción de invertasa (Romero-Gómez, 2001; Montiel-González y col., 2002).

#### **5.1.2.1 Conservación y propagación de la cepa**

La propagación se llevó a cabo en tubos inclinados con agar papa dextrosa (PDA), los cuales se incubaron a 30° C por siete días. Para la resiembra de la cepa se partió de un tubo inclinado al que se le agregaron 5 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05% (v/v), homogeneizándose con un vórtex, se tomaron alícuotas de 1 mL para inocular matraces Erlenmeyer con 50 mL de PDA estéril, los cuales se incubaron a 30° C por siete días.

#### **5.1.2.2 Preparación del inóculo**

Las esporas fueron cosechadas agregando a los matraces Erlenmeyer 30 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05% (v/v) por matraz, se agitó con una barra magnética para suspender las esporas. Para el conteo de esporas, se tomó una alícuota de 1 mL la cual se diluyó 1:20 con agua destilada. Las esporas fueron cuantificadas por medio de una cámara de Neubauer. Cada fermentación se inoculó con una suspensión de esporas a fin de tener una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de soporte seco.

### **5.2 Sustratos y medios de fermentación**

Se empleó dos tipos de soportes en los experimentos realizados, un soporte-sustrato y un soporte inerte impregnado con un medio líquido. El primero consiste en un residuo agro-industrial (salvado de trigo) y el segundo en un mineral.

### **5.2.1 Medio de fermentación en los estudios con soporte-sustrato**

Para la preparación del medio de fermentación se emplearon salvado de trigo IHLA® (Industria Harinera la Asunción S.A. de C.V.) y harina de soya (Alltech® Full Fat Soy) como sustrato para el crecimiento del microorganismo usado (*Aspergillus niger* AT). En la Tabla 5.2 se muestra la composición de estos sustratos en base seca.

#### **5.2.1.1 Preparación del medio de fermentación.**

El medio de fermentación contuvo un 55% en peso de medio seco y un 45% de contenido de humedad. Del medio seco, 70% fue salvado de trigo y 30% de harina de soya; de la humedad: 70% es agua estéril y 30% inóculo húmedo que se obtuvo de los matraces con medio de inóculo (el volumen de inóculo se tomó en cuenta como volumen de agua). Se agregó la mitad (50%) del contenido de humedad total (agua destilada más inóculo) que se requiere y se mezcló hasta que se observó que la mezcla fue homogénea. Se esterilizó el medio de fermentación durante 40 min a 120° C. Se adicionó el 50% restante del contenido de humedad incluyendo la cantidad de inóculo necesaria. Se colocó el medio de fermentación en charolas.

#### **5.2.1.2 Formula mínima para el sustrato-soporte en la FMS**

Considerando la composición elemental basada en carbono para la proteína ( $\text{CH}_{1.94}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.27}$ ), grasa ( $\text{CH}_{1.84}\text{O}_{0.114}$ ), carbohidratos ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) y fibra ( $\text{CH}_{1.67}\text{O}_{0.83}$ ) (Smits y col., 1996; Pomeranz y Shellenberger, 1971) se obtuvieron las composiciones elementales basadas en carbono para el salvado de trigo ( $\text{CH}_{1.7216}\text{O}_{0.76044}\text{N}_{0.046005}$ ) y la harina de soya ( $\text{CH}_{1.9251}\text{O}_{0.6003}\text{N}_{0.12013}$ ). En la Tabla 5.2 se muestra la composición en fracción másicas de los sustratos empleados en la fermentación.



**Tabla 5.2** Composición de los componentes del medio de fermentación con soporte-sustrato.

<b>Componente</b>	<b>Salvado de Trigo</b>	<b>Harina de Soya</b>
Proteínas	0.159	0.424
Grasa	0.031	0.213
Carbohidratos	0.620	0.280
Fibra	0.121	0.036
Ceniza	0.070	0.047

Como se señaló arriba, el soporte- sustrato empleado en la fermentación constó de 70% de salvado de trigo y 30% de harina de soya, por lo que la composición elemental basada en carbono para el sustrato fue  $\text{CH}_{1.78265}\text{O}_{0.712316}\text{N}_{0.0682414}$ .

### 5.2.1.3 Composición en fracción másica del medio de FMS

Se consideró la siguiente composición del medio de fermentación que incluyó el salvado de trigo (70% del sólido seco), la harina de soya (30% del sólido seco), así como la cantidad de agua para la fermentación (46%). Tomando los datos mostrados en la Tabla 5.2 se construyó la Tabla 5.3 que muestra la composición del medio de fermentación:

**Tabla 5.3** Composición del medio de fermentación.

<b>Componente</b>	<b>Fracción másica</b>
Agua	0.460
Proteína	0.129
Grasa	0.046
Carbohidratos	0.280
Fibra	0.052
Ceniza	0.034
<b>Total</b>	<b>1.000</b>

### 5.2.2 Medio de fermentación en los estudios con soporte inerte.

Para los estudios con soporte inerte, se empleó agrolita (perlita expandida) impregnada con un medio líquido definido (Pontecorvo, 1953).

#### 5.2.2.1 Medio de fermentación.

Se utilizó la composición del medio Pontecorvo con 0.05% de extracto de levadura (ATCC 687). Se preparó medio basal (concentrado 16.6 veces). En las Tablas 5.4 y 5.5 se detalla la composición.

Para la preparación de la solución de elementos traza, los elementos fueron disueltos en 850 mL de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH a 3.5 con una solución de ácido clorhídrico al 10% (v/v) y finalmente se aforó a 1 L con agua destilada.

**Tabla 5.4** Composición del medio Pontecorvo modificado.

Componente	Cantidad (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	100.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25.33
KCl	8.67
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.67
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01
Sacarosa	500
Extracto de levadura	8.33
Elementos traza	1 mL

**Tabla 5.5** Elementos traza.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	1.67
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.83
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4.17

Para la preparación del medio de fermentación fueron disueltas cada una de las sales en 500 mL de agua destilada, después se disolvió el extracto de levadura y finalmente la sacarosa. Por último el medio se aforó a 1 L con agua destilada y se le adicionó 1 mL de la solución de elementos traza.

Las cantidades del medio Pontecorvo, agrolita y agua fueron ajustadas para tener una concentración inicial de sacarosa de 200 mg por gramo de soporte inerte seco con un contenido de agua y un pH inicial de 50% y 6.0 respectivamente.

Considerando la composición del medio Pontecorvo y del medio de fermentación (Tablas 5.4 y 5.5) que fueron usados en los experimentos con soporte inerte se construyó la Tabla 5.6 que expresa la composición del medio de fermentación en fracciones másicas para cada componente.

**Tabla 5.6** Composición del medio de fermentación

<b>Componente</b>	<b>Fracción másica</b>
Agua	0.495
Agrolita	0.403
Proteína	0.001
Carbohidratos	0.081
Ceniza	0.020
<b>Total</b>	<b>1.000</b>

### **5.2.2.2 Soporte inerte**

Como soporte se utilizó agrolita (perlita expandida) que fue tamizada hasta lograr un tamaño de partícula de 0.34 - 0.51 mm, la agrolita se lavó dos veces con agua caliente y posteriormente dos veces con agua destilada fría, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente, para lograr un secado completo del soporte inerte (SI) se secó en una estufa a 60 °C por 24 horas.

## **5.3 Disposición del medio de fermentación**

Los estudios realizados requirieron la disposición del medio de fermentación en charolas de diferentes tamaños y en matraces también para los estudios en soporte-sustrato.

### **5.3.1 Charolas**

Para los experimentos con soporte inerte, las charolas fueron empacadas con el medio de fermentación a fin de obtener alturas del lecho de 1.0 y 2.0 cm, manteniendo una densidad de empaque constante de 421 Kg·m<sup>-3</sup>.

Para los experimentos con soporte-sustrato, las charolas fueron empacadas con el medio de fermentación a fin de obtener distintas alturas de lecho en cada una de las fermentaciones desarrolladas, manteniendo una densidad de empaque (aparente),  $\rho_a$ , constante de 370 Kg·m<sup>-3</sup>, en todos los casos. Las charolas fueron empacadas a alturas de lecho de fermentación de 0.20, 0.67, 0.92 y 1.0 cm.

### **5.3.2 Matraces**

Los matraces solo fueron usados en los experimentos con soporte-sustrato. Se agregó a los matraces la cantidad necesaria de medio para que el espesor del lecho de fermentación en cada uno de ellos fuera de aproximadamente 1 cm; estos matraces sirvieron como control o blanco en cada una de las fermentaciones llevadas a cabo.

## **5.4 Medición de variables de la FMS**

Los métodos que fueron empleados para la medición de variables durante la realización del trabajo experimental son descritos en las secciones siguientes.

### **5.4.1 Temperatura**

La temperatura en los distintos puntos del biorreactor y en el lecho de fermentación en las charolas fue medida empleando termopares de sonda de penetración tipo K especiales para alimentos con punta hipodérmica. Los termopares tienen un tiempo de respuesta de 10 segundos y sirven para un rango de temperatura de -250 a 371° C.

Para los experimentos con soporte-sustrato los termopares fueron conectados a un termómetro digital manual de 12 canales de Cole-Parmer® Instrument Company, con una resolución de 0.1° C. Los datos fueron capturados manualmente.

Para los experimentos con soporte inerte los termopares fueron conectados a un termómetro digital de barrido de 12 canales con capacidad de captura automática de las lecturas. Los datos almacenados son transferidos a un ordenador para su análisis.

### **5.4.2 Registro en línea de CO<sub>2</sub>**

Los gases de salida del biorreactor fueron analizados por un equipo llamado Metabolímetro, desarrollado en la UAM-Iztapalapa, el cual tiene acoplado un analizador de gases (Infrared CO<sub>2</sub> Controller, Fuji Electric Systems Co., Ltd.), que indica el resultado y simultáneamente genera una señal analógica. La señal analógica es enviada a una tarjeta de captura cuya señal es interpretada por un software diseñado con el lenguaje Turbo Pascal, también desarrollado en la UAM-Iztapalapa (Sistema de Monitoreo de CO<sub>2</sub>). El analizador emplea un sistema de rayo infrarrojo de no-dispersión. El analizador mide un rango de 0 a 5% de CO<sub>2</sub>. El equipo fue calibrado con gases al inicio de cada experimento, a 0% con nitrógeno y al 5% con una mezcla de gases conteniendo dicho porcentaje de CO<sub>2</sub>.

### 5.4.3 Contenido de humedad del lecho de fermentación

En las fermentaciones con soporte-sustrato se midió únicamente la humedad inicial y final de la fermentación. Debido a que no podían ser tomadas muestras del lecho de fermentación por la posible contaminación del lecho. La humedad de las muestras analizadas se determinó por la pérdida de peso (agua), en una termobalanza (OHAUS® Moisture Determination Balance), cuya fuente de calor es una lámpara de rayos infrarrojos, de acuerdo al procedimiento siguiente:

- Se colocó un gramo de muestra sobre una charola de aluminio en la balanza previamente calibrada.
- Se ajustó la potencia de la lámpara de rayos infrarrojos a una potencia de 5 watts.
- Se colocó la lámpara de rayos infrarrojos sobre la muestra a una distancia aproximada de 6 cm.
- Se ajustó el tiempo de exposición a la fuente de calor en 15 min.
- Inmediatamente después de haber terminado el tiempo de exposición se observó la lectura de peso que señala la balanza.
- Se realizó el siguiente cálculo:

$$\% \text{Humedad} = \%H = \frac{(MH - MS)}{MH} \times 100$$

Donde *MH* es el peso de la muestra húmeda (1 g), *MS* es el peso de la muestra seca.

En los experimentos con soporte inerte, se midió la humedad durante la fermentación al tomar muestras del lecho en determinados tiempos durante el proceso. La humedad de las muestras fue determinada por pérdida de peso (agua) en una termobalanza (OHAUS® Moisture Determination Balance, Model MB35). Se colocó una muestra mayor a 0.5 g y se usó una temperatura de secado de 130° C, cuando no hubo un cambio en el peso por 90 segundos la termobalanza arrojó la lectura de humedad.

#### 5.4.4 pH de las muestras

Para la fermentación donde se utilizó el residuo agro-industrial el pH se determinó únicamente al inicio y al final de la fermentación. Para la fermentación donde se utilizó el soporte inerte el pH se midió al inicio, final y en diferentes tiempos durante la fermentación. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- Se pesó un gramo de muestra húmeda.
- Se agregó 20 mL de agua destilada.
- Se mezcló perfectamente en un vórtex durante 2 minutos.
- Se separó a las partículas sólidas con un pedazo de algodón en un embudo.
- Se determinó el pH del filtrado directamente en un pHmetro Conductronic® pH120, previamente calibrado.

#### 5.4.5 Actividad de agua

La actividad de agua ( $a_w$ ) se midió como la relación entre la presión de vapor generada por la muestra y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Se determinó mediante el equipo AquaLab, modelo CX-2 el cual emplea la técnica de punto de rocío en espejo frío. El equipo midió la  $a_w$  al enfriar y calentar repetidamente un espejo de lámina de acero en el interior del aparato, en el cual se forma el rocío y es secado sucesivamente. Este proceso es acelerado mediante una corriente de aire generada por el ventilador del aparato. Cada vez que se forma el rocío sobre el espejo, el equipo mide la temperatura y la  $a_w$  de la muestra, los valores son almacenados y comparados sucesivamente en cada repetición. Cuando los valores consecutivos de  $a_w$  tienen una diferencia menor a 0.001 se completa la medición y se reporta el valor de  $a_w$  encontrado y la temperatura de la muestra.

Para la fermentación en soporte inerte la  $a_w$  se midió al inicio, final y en diferentes tiempos durante la fermentación. Para la fermentación en soporte-sustrato la  $a_w$  se midió únicamente al inicio y al final de la fermentación. El procedimiento es descrito a continuación:

- Se encendió el equipo 20 minutos antes de la determinación para permitir el calentamiento de los sensores.
- Se colocó agua destilada en una celda de determinación, llenando solo hasta la mitad.
- Se esperó hasta que el aparato determinó el valor de  $a_w$ , que debe ser de uno, sino es así, se ajusta.
- Se tomó una muestra y se colocó en la celda de determinación, llenando sólo hasta la mitad para proteger los sensores en el interior del instrumento.
- Se inició el proceso de determinación y se esperó hasta que el aparato reportó los valores de  $a_w$  y la temperatura de la muestra.

#### 5.4.6 Pérdida de materia seca

El procedimiento para determinar la pérdida de materia seca en las charolas empleadas en los experimentos realizados en el biorreactor se detalla a continuación:

- Se determinó la humedad inicial del medio de fermentación inoculado.
- Una vez que el medio de fermentación se vació y distribuyó de manera uniforme en la charola y ésta fue cerrada se pesó todo.
- Se pesó nuevamente la charola a final de la fermentación.
- Se determinó la humedad al final de la fermentación.
- La pérdida de materia seca se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$PMS = MSI - MSF$$

Donde  $PMS$  es la pérdida de materia seca y  $MSI$  y  $MSF$  son la materia seca inicial y final, respectivamente. Estas últimas son calculadas de la siguiente manera:

$$MSI = (MTI - Mch) \times \left(1 - \frac{\%H_i}{100}\right)$$



$$MSF = (MTF - Mch) \times \left(1 - \frac{\%H_f}{100}\right)$$

Donde  $MTI$  y  $MTF$  son las masas del medio de fermentación totales inicial y final respectivamente, que incluyen el peso de medio de fermentación ( $MHI$  y  $MHF$  respectivamente) y el peso de la charola ( $Mch$ )

#### **5.4.7 Densidad aparente del lecho de fermentación**

La densidad aparente del lecho de fermentación sólo fue medida al final de los experimentos para evitar contaminaciones. Para determinar la densidad del lecho de fermentación se requirió conocer  $MHF$  (masa final de medio fermentación húmedo) y  $VHF$  (volumen final de medio de fermentación húmedo). El procedimiento para la determinación de estos valores se detalla a continuación:

La  $MHF$  se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$MHF = MTF - Mch$$

Para la determinación del volumen fue necesario conocer el área de la base de la charola ( $A$ ), que es igual al área superficial del lecho de fermentación y el espesor del lecho.

Se midió el espesor ( $L$ ) del lecho con un vernier en cinco lugares elegidos al azar sobre el lecho de fermentación.

El  $VHF$  se calculó con la siguiente fórmula:

$$VHF = A \times L$$

La densidad del lecho de fermentación ( $\rho_b$ ) se determinó con la siguiente fórmula:

$$\rho_b = \frac{MHF}{VHF}$$

#### 5.4.8 Flujo de aire

Para un flujo de aire menor a 1000 cm<sup>3</sup>/min se determinó mediante el uso de un medidor de flujo (flujómetro) digital de J&W Scientific modelo ADM2000 Intelligent Flowmeter™. Para un flujo mayor a 1000 cm<sup>3</sup>/min se empleó un rotámetro de Glimont® modelo 40490 el cual puede medir flujos de aire en el rango de 0 a 18 L/min.

#### 5.4.9 Velocidad de aire

Para los experimentos realizados con ventiladores, la velocidad del aire se midió con un anemómetro TurboMeter™ de Davis Instruments. El anemómetro mide las revoluciones por minuto (rpm) de un ventilador que tiene integrado.

Para los experimentos realizados sin ventiladores se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$v_{aire} = \frac{G}{A_t}$$

Donde  $v_{aire}$  y  $G$  son la velocidad y el flujo de aire respectivamente y  $A_t$  es el área transversal a la dirección de la corriente del aire dentro del biorreactor. El área transversal se obtuvo de la diferencia entre el área transversal de reactor y el área transversal de las charolas.

#### 5.4.10 Número de Reynolds ( $N_{Re}$ )

De acuerdo con la bibliografía (Holman, 1998; Incropera y DeWitt, 1996), para un flujo paralelo a una placa plana, el  $N_{Re}$  se define como:

$$N_{Re} = \frac{L v_{aire} \rho_{aire}}{\mu_{aire}}$$

Donde  $L$  es la longitud de la charola paralela al flujo de aire;  $v_{aire}$ ,  $\rho$  ( $0.86 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) y  $\mu$  ( $1.86 \times 10^{-5} \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) son la velocidad, densidad y viscosidad del aire dentro del biorreactor, respectivamente.

#### **5.4.11 Humedad del aire**

La humedad del aire se determinó a través de un termo-higrómetro digital de Vaisala® modelo Vaisala RH™ el cual ofrece los datos simultáneos de temperatura y humedad.

### **5.5 Métodos analíticos**

A continuación se detallan los métodos analíticos que fueron usados para la determinación de la concentración de biomasa, la medición de la concentración de sustrato; así como las técnicas empleadas para medir las actividades enzimáticas presentes en los lechos de fermentación en los experimentos realizados.

#### **5.5.1 Determinación de la concentración de biomasa**

La biomasa sólo se midió en los experimentos realizados con soporte inerte, debido a las facilidades que presenta para separar los componentes del medio.

La concentración de biomasa fue medida indirectamente mediante el análisis de su contenido de proteína. Se usó un kit (Bio-Rad® DC protein assay) de ensayo de proteína, que es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteína a partir de una solubilización con detergente. La reacción es similar al ensayo de Lowry (Lowry y col., 1951) pero ha sido modificada para ser más rápida. El procedimiento fue el siguiente:

- Se pesó 0.2 g de muestra seca del lecho de fermentación y se añadió a un tubo de ensayo.
- Se adicionó a la muestra 5 mL de NaOH 0.5 N.
- Se incubó a ebullición por 10 minutos.
- Se enfrió los tubos con agua a temperatura ambiente.

- Se filtró el contenido de los tubos.
- Se tomó una muestra de 200  $\mu\text{L}$  y se analizó mediante el procedimiento de micro ensayo propuesto en el kit colorimétrico.

La curva de calibración fue producida con biomasa seca de *Aspergillus niger* C28B25.

### **5.5.2 Análisis de azúcares**

La concentración de azúcares al inicio y final de la fermentación se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se usó una columna Phenomenex REZEX para ácidos orgánicos, con una longitud de 300 mm un diámetro interno de 7.8 mm y un tamaño de partícula de 8  $\mu\text{m}$ . La temperatura de operación fue de 35° C, como fase móvil se utilizó ácido sulfúrico 5 mN, filtrado y desgasificado, a un flujo de 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , los compuestos se detectaron mediante un detector de índice de refracción Perkin Elmer LC-30. Como estándar se utilizó una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa, con una concentración final de 3 g/L (1 g/L de cada soluto) y soluciones individuales de cada soluto con concentraciones de 1 g/L.

### **5.5.3 Actividades enzimáticas**

Para los experimentos llevados a cabo en soporte-sustrato se midió la presencia de la actividad enzimática de la fitasa. Para los experimentos con soporte inerte se midió la presencia de la actividad enzimática de la invertasa. A continuación se detallan las metodologías llevadas a cabo para cada caso.

#### **5.5.3.1 Actividad enzimática de la fitasa**

El ensayo se la actividad de la fitasa se basa en la hidrólisis del fitato (sustrato), evaluando la cantidad de fosfato inorgánico liberado. Se construyó una curva estándar en un rango de concentraciones de 0 a 2.5 micromoles de fosfato. La cuál se realizó de la siguiente forma:

- A una serie de tubos marcados del 1 al 6, se le adicionó 1 mL de agua destilada a cada uno de ellos.
- Al tubo # 1 se le adicionó 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM) se agitó y se agregó 1 mL de este tubo al tubo # 2 y así sucesivamente hasta el tubo # 5. El tubo # 6 se tomó como blanco.
- De cada tubo se tomó 50  $\mu\text{L}$  por duplicado. Se agregó 2.45 mL de agua, 0.5 mL de molibdato ácido y 0.125 mL de solución Fiske y Subba Row y se agitó.
- Se dejó reposar 10 minutos e inmediatamente después de este tiempo se midió la absorbancia a 660 nm, ajustando a cero el espectrofotómetro con el tubo # 6.
- Se calculó la regresión de la concentración de fosfato vs absorbancia.

La concentración final de fosfato en estos tubos fue la siguiente:

Número de Tubo	Contenido de P por tubo ( $\mu\text{mol}$ )
1	0.00
2	2.50
3	1.25
4	0.63
5	0.31
6	0.16

Para medir la actividad de la fitasa presente en el medio de fermentación sólido, se homogenizó el medio de fermentación de cada columna, charola o matraz, después de 120 h de fermentación y pesó y añadió 1 g del mismo a un tubo de ensayo con 20 mL de agua destilada. Se agitó vigorosamente durante 2 minutos en un vórtex (Caframo Leax, 2000) y filtró con algodón absorbente para obtener el extracto enzimático. A 0.5 mL de extracto enzimático se le adicionó 4.5 mL de agua destilada para diluirlo. En otro tubo de ensayo se añadió 2.5 mL de fitato de sodio 3 mM y 2 mL de amortiguador de acetatos 1 M a pH de 5.5, se incubó durante 10 min a 37° C y se adicionó 0.5 mL del extracto enzimático diluido obtenido anteriormente (Shieh y col., 1969).

Posteriormente se incubó en un baño de agua (Lauda MAG) a temperatura controlada de 37° C durante 30 minutos. Se tomó 0.1 mL del tubo incubado y se añadió a otro tubo con 0.9 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 8.9%, para detener la reacción, se agitó y se dejó reposar durante 10 minutos. Después se agregó al tubo con TCA, 0.5 mL de molibdato de amonio, que se preparó con 1.25% de molibdato de amonio y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N, también se agregó 1.5 mL de agua destilada y 1.25 mL del reactivo de Fiske y Subba Row, que se preparó con 1.59 g del reactivo en 10 mL de agua destilada, se agitó y se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se procedió a leer a 660 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-160A), los resultados se obtuvieron interpolando los puntos problema, en una curva estándar realizada previamente. La concentración de fósforo se calculó a partir de la absorbancia medida con la regresión lineal de la curva estándar. Una unidad de actividad (U) fitasa, se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un microgramo de fosfato inorgánico por minuto a pH de 5.5 a 37° C.

Se usó la siguiente ecuación para calcular las unidades de actividad fitasa (U/g)

$$\frac{U}{g} = \frac{50 \cdot dC \cdot D \cdot 96}{30}$$

50 = Corrección por diluciones.

30 = Tiempo de incubación en minutos.

*D* = Factor de dilución de la enzima.

96 = Número de microgramos por micromol.

*dC* = Concentración de fosfatos calculada por regresión de la curva estándar.

La actividad enzimática relativa es el cociente de la actividad enzimática obtenida en el lecho de fermentación del biorreactor entre la actividad enzimática presente en los controles (matraces).

### 5.5.3.2 Actividad enzimática de invertasa

Para determinar la actividad enzimática de la invertasa durante la fermentación se realizó el método descrito por Miller (1960), utilizando el reactivo DNS. El procedimiento es el siguiente:

1) Se preparó el reactivo DNS de la siguiente manera:

- a) Se disolvió 10 g de NaOH en 500 mL de amortiguador de acetatos 0.1M a pH 5 en un matraz aforado de 1 L
- b) Se disolvió 0.5 g de sulfito de sodio, 2 g de fenol, 200 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico; aforándose a 1 L. La solución se mantuvo en agitación continua hasta la disolución completa de cada reactivo antes de agregar el siguiente.

2) Se preparó la solución estándar de azúcares reductores (1 mg de azúcares reductores/mL), adicionando 250 mg de glucosa y 250 mg de fructosa en 500 mL de amortiguador de acetatos 0.1 M a pH 5.

3) Para obtener la curva estándar se realizó el siguiente procedimiento:

- a) En tubos etiquetados del 1 al 7 se adicionó 1 mL de amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5.
- b) Al tubo 1 se adicionó 1 mL de solución estándar y se agitó en un vórtex.
- c) Al tubo 2 se adicionó 1 mL del tubo anterior, así hasta llegar al tubo 5, al cual después de la agitación se extrajo 1 mL.
- d) Los tubos 6 y 7 contienen únicamente amortiguador de acetatos 0.1M, éstos fueron usados como blanco.

4) Para la determinación del ensayo enzimático de 7 extractos (por cada soporte), se utilizó dos tubos de ensayo (A y B) para cada análisis de actividad enzimática, el tubo A se utilizó

para la reacción enzimática y el tubo B como testigo (por duplicado). El procedimiento es el siguiente:

- a) Se preparó el sustrato que consiste en una solución de sacarosa 0.1M en amortiguador de acetatos 0.1M a pH 5.
  - b) En ambos tubos se agregó 0.9 mL de una solución de sacarosa y fueron incubados a 50 °C por 5 minutos.
  - c) Al tubo B se agregó 1.5 mL del reactivo DNS.
  - d) En ambos tubos se adicionó 0.1 mL de extracto enzimático cada 30 segundos, agitando con vórtex, para homogeneizar en cada adición.
  - e) Posteriormente, pasados 10 minutos de incubación a 50° C para cada tubo, se adicionó 1.5 mL del reactivo DNS a los tubos A en intervalos de 1 minuto.
- 5) Tanto los tubos de la curva estándar como los tubos del ensayo enzimático fueron colocados en baño de agua a temperatura de ebullición por 15 minutos.
- 6) Al finalizar este tiempo, se dejaron enfriar en agua corriente hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- 7) Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda25 a una longitud de onda de 640 nm.
- 8) Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto.

### **5.6 Estimación de propiedades físicas y termodinámicas del medio de fermentación**

Algunas propiedades físicas de los sustratos empleados pueden ser estimadas a fin de facilitar su uso en cálculos y procedimientos.



### 5.6.1 Densidad real o de sólido

La densidad real de los sustratos empleados en FMS es difícil de determinar por métodos analíticos y depende de la composición y la temperatura de los mismos. Las densidades individuales ( $\rho_i$ ) de cada componente y la densidad de composición (de partícula) puede ser determinada con las siguientes formulas (Toledo, 1994):

$$\begin{aligned}\rho_w &= 997.18 + 0.0031439 T - 0.0037574 T^2 \\ \rho_p &= 1329.9 - 0.51814 T \\ \rho_f &= 925.59 - 0.41757 T \\ \rho_c &= 1599.1 - 0.31046 T \\ \rho_{fi} &= 1311.5 - 0.36589 T \\ \rho_a &= 2423.8 - 0.28063 T\end{aligned}$$

Donde  $\rho_w$ ,  $\rho_p$ ,  $\rho_f$ ,  $\rho_c$ ,  $\rho_{fi}$  y  $\rho_a$  son las densidades individuales para el agua (w), proteína (p), grasa (f), carbohidrato (c), fibra (fi) y cenizas (a) respectivamente y  $T$  es la temperatura de la sustancia o mezcla. La densidad de composición (de partícula), se calcula con la siguiente ecuación (Toledo, 1994):

$$\rho_b = \frac{1}{\sum X_i / \rho_i}$$

### 5.6.2 Conductividad térmica del sustrato sólido

Se aplicó el procedimiento propuesto por Choi y Okos (1987), el cual permite estimar la conductividad térmica ( $k$ ) de una sustancia a partir de las conductividades puras de sus componentes ( $k_i$ ), y la fracción volumétrica de cada componente,  $X_{vi}$  (Choi y Okos 1987):

$$k_b = \sum (k_i X_{vi})$$

Los valores de conductividad en  $W \cdot (m \cdot K)^{-1}$  son calculados a la temperatura ( $T$ ) en  $^{\circ}C$  que se esté considerando con las ecuaciones siguientes (Choi y Okos, 1987):

$$\begin{aligned}
 k_w &= 0.57109 + 0.0017625 T - 6.7306 \times 10^{-6} T^2 \\
 k_p &= 2.2196 + 0.0062489 T + 1.0154 \times 10^{-4} T^2 \\
 k_f &= 0.1807 + 0.0027604 T - 1.7749 \times 10^{-7} T^2 \\
 k_c &= 0.2014 + 0.0013874 T - 4.3312 \times 10^{-6} T^2 \\
 k_{fi} &= 0.18331 + 0.0012497 T - 3.1683 \times 10^{-6} T^2 \\
 k_a &= 0.3296 + 0.001401 T - 2.9039 \times 10^{-6} T^2
 \end{aligned}$$

Donde  $k_w$ ,  $k_p$ ,  $k_f$ ,  $k_c$ ,  $k_{fi}$  y  $k_a$ , son las conductividades para agua, proteína, grasa, carbohidratos, fibra y cenizas respectivamente.

La fracción volumétrica de cada componente es determinada a partir de la fracción másica,  $X_i$ , y de las densidades individuales  $\rho_i$  y la densidad real  $\rho_{bs}$  descritas anteriormente con la siguiente ecuación:

$$X_{vi} = \frac{X_i \rho_{bs}}{\rho_i}$$

### 5.6.3 Conductividad térmica del lecho de fermentación

La conductividad del lecho de fermentación se calculó conociendo el valor de la fracción volumétrica del sustrato,  $X_{vb}$  y de espacio vacío (aire)  $X_{va}$ . La fracción volumétrica del sustrato se calculó con la siguiente formula considerando que la fracción másica del sustrato es igual a 1:

$$X_{vb} = \frac{X_b \rho_{ap}}{\rho_{bs}}$$

Donde  $X_b$  es la fracción másica del sustrato,  $\rho_{ap}$  y  $\rho_{bs}$  son las densidades aparente y real que ya fueron descritas anteriormente. La fracción volumétrica de aire ( $X_{va}$ ) se calculó por diferencia mediante la siguiente fórmula:

$$X_{va} = 1 - X_{vb}$$

Conociendo los valores de  $X_{vb}$  y  $X_{va}$  la conductividad aparente  $k_{ap}$  se calculó de la misma manera que la conductividad real con la siguiente fórmula:

$$k_{ap} = k_a X_{av} + k_{bs} X_{bv}$$

#### 5.6.4 Capacidad calorífica

La capacidad calorífica o calor específico es la cantidad de calor que es ganado o perdido por cantidad de masa de una sustancia que acompaña un cambio de temperatura sin un cambio de estado. La capacidad calorífica de una sustancia es definida por sus componentes (Singh y Heldman, 1993).

En la bibliografía se encontraron las siguientes ecuaciones para la estimación de la capacidad calorífica del medio de fermentación:

Singh y Heldman (1993):

$$C_p = 1.424m_c + 1.549m_p + 1.675m_f + 0.837m_a + 4.187m_w$$

Lewis (1991):

$$C_p = 1.4m_c + 1.6m_p + 1.7m_f + 0.8m_a + 4.19m_w$$

Choi y Okos (1983):

$$C_p = 1.547m_c + 1.711m_p + 1.928m_f + 0.908m_a + 4.180m_w$$

Donde,  $m_c$ ,  $m_p$ ,  $m_f$ ,  $m_a$  y  $m_w$  son las fracciones másicas individuales de carbohidratos (c), proteínas (p), grasas (f), cenizas (a) y agua (w).

Empleando los datos de la Tabla 5.3 en las ecuaciones descritas anteriormente se obtuvo los valores de 2.70, 2.70 y 2.77  $\text{KJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$  respectivamente, se decidió usar un valor de 2.7  $\text{KJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$  para los cálculos desarrollados en el presente trabajo. En la bibliografía

(Sangsurasak y Mitchell, 1995) se señalan que para este tipo de sustratos la capacidad calorífica se encuentra alrededor de  $2.5 \text{ KJkg}^{-1}\text{K}^{-1}$ , por lo que la estimación obtenida es adecuada.

### 5.6.5 Propiedades físicas y termodinámicas de los lechos de fermentación

Considerando los métodos de estimación mencionados anteriormente y la composición en fracción másica de los medios de fermentación empleados indicados en las Tablas 5.3 y 5.6, se presenta la Tabla 5.7 con los valores de las propiedades físicas y termodinámicas estimadas.

**Tabla 5.7.** Propiedades termodinámicas del los lechos de fermentación.

Propiedad	Medio de Fermentación	
	Soporte inerte	Soporte-sustrato
Densidad aparente $\rho_{\text{app}}$ ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )	421	380
Densidad real $\rho$ ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )	1000.86	1189.35
Conductividad de sustrato $k$ ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$ )	0.340	0.437
Conductividad del lecho $k_b$ ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$ )	0.246	0.158
Capacidad calorífica $Cp_b$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )	2.568	2.708

## 5.7 Equipo para la FMS

Para los experimentos realizados se tienen tres subsistemas que deben ser controlados y acondicionados a fin de llevar a cabo las fermentaciones que permitan cumplir con los objetivos propuestos en el presente trabajo: charolas, biorreactor de charolas y sistema para la circulación interna de aire.

### 5.7.1 Charolas

Para el caso de las fermentaciones en soporte-sustrato, los experimentos fueron realizados en charolas tapadas debido a la susceptibilidad del microorganismo a contaminarse por su crecimiento lento. Se emplearon dos tamaños de charolas de aluminio puro ALCAN® de  $29.5 \times 19.5 \times 3.5 \text{ cm}$  y de  $12.3 \times 18.7 \times 2.7 \text{ cm}$ , las cuales fueron modificadas manualmente

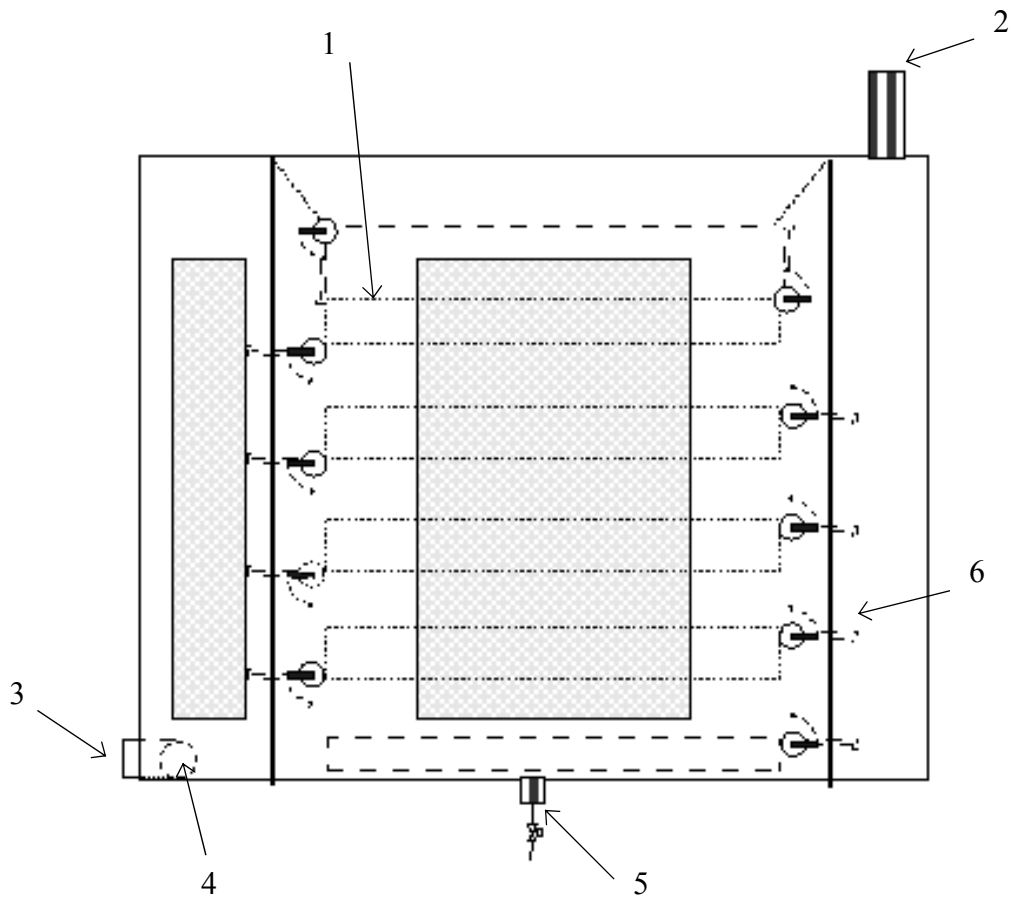
a fin de usarlas como tapa o como base para la charola; el espesor de lamina de las charolas es  $1 \times 10^{-4}$  m. Para la medición de temperatura en el lecho de las charolas fue hecha una perforación en cada charola, en uno de los lados, en el fondo de la charola para introducir la sonda de penetración del termopar.

Para el caso de las fermentaciones en soporte inerte, los experimentos fueron realizados en charolas abiertas debido al crecimiento rápido del microorganismo y a su menor susceptibilidad a ser contaminado. Se emplearon dos tipos de charolas de aluminio puro (ALCAN®) por experimento, dos charolas grandes ( $18.7 \times 12.3 \times 2.7$  cm) y 12 charolas pequeñas ( $7 \times 5 \times 2.5$  cm) que fueron colocadas en el biorreactor. Las charolas grandes fueron empleadas para la medición de la temperatura en línea durante la fermentación. A estas charolas se les hizo una perforación a fin de poder introducir la sonda de penetración del termopar para medir la temperatura. Las charolas pequeñas fueron empleadas para muestreo durante la fermentación extrayendo un par de ellas en determinados tiempos.

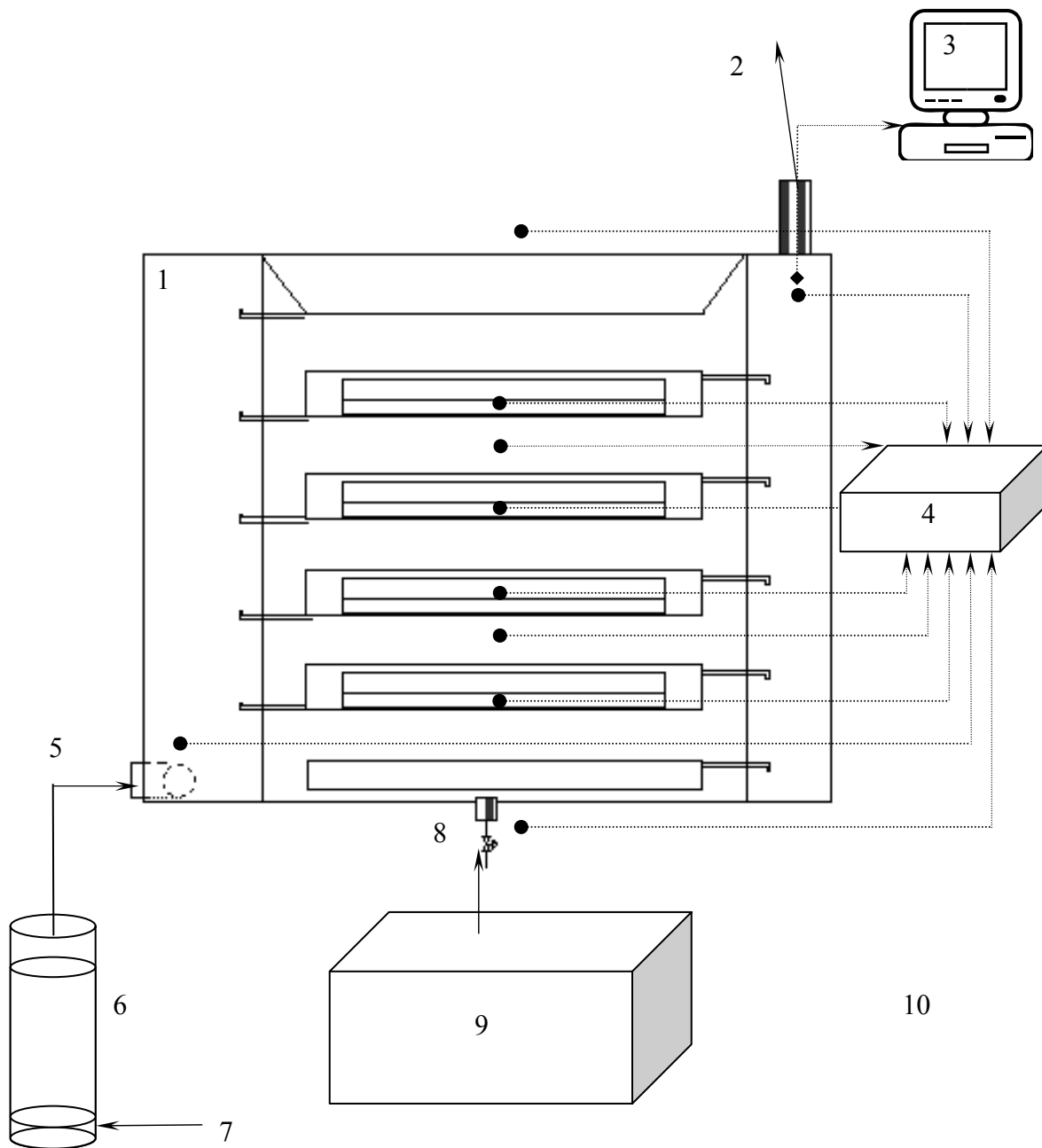
### **5.7.2 Biorreactor de charolas**

Se empleó un biorreactor de charolas desarrollado en la UAM Unidad Iztapalapa, fabricado en acero inoxidable y con ventanas de vidrio templado en la puerta y en las partes laterales del mismo. El reactor tiene capacidad para cuatro charolas y posee diversos accesos para el monitoreo de variables como temperatura y humedad, así como entrada y salida para el aire que se alimenta al mismo. En la Figura 5.3 se muestra el reactor empleado con sus principales características.

El reactor de charolas fue colocado en un cuarto con temperatura controlada ( $30^{\circ}$  C) a fin de disminuir los efectos de los cambios de la temperatura del ambiente. Para satisfacer la demanda de oxígeno y aire de los microorganismos empleados en la fermentación, así como disminuir la pérdida de agua (secado) de los lechos de fermentación, se alimentó al biorreactor un flujo de aire saturado con agua.



**Figura 5.3.** Biorreactor de Charolas. 1: soporte de charola; 2: salida de aire; 3: entrada de aire; 4: distribuidor de aire; 5: purga de agua; 6: manivela de ventilas.



**Figura 5.4** Sistema de monitoreo de fermentación en biorreactor de charolas. 1: biorreactor, 2: salida de aire, 3: determinación y registro de  $\text{CO}_2$  (metabolímetro), 4: determinación y registro de temperatura (termómetro digital), 5: entrada de aire saturado, 6: saturador, 7: entrada de aire seco, 8: entrada de vapor de agua, 9: humidificador, 10: cuarto a temperatura controlada.

En la Figura 5.4 se muestra la forma en que fueron dispuestos los equipos para la realización de los experimentos en el biorreactor de charolas. También se muestra las posiciones dentro del biorreactor donde se realizaron las mediciones de temperatura.

### 5.7.3 Sistema para la circulación interna forzada de aire

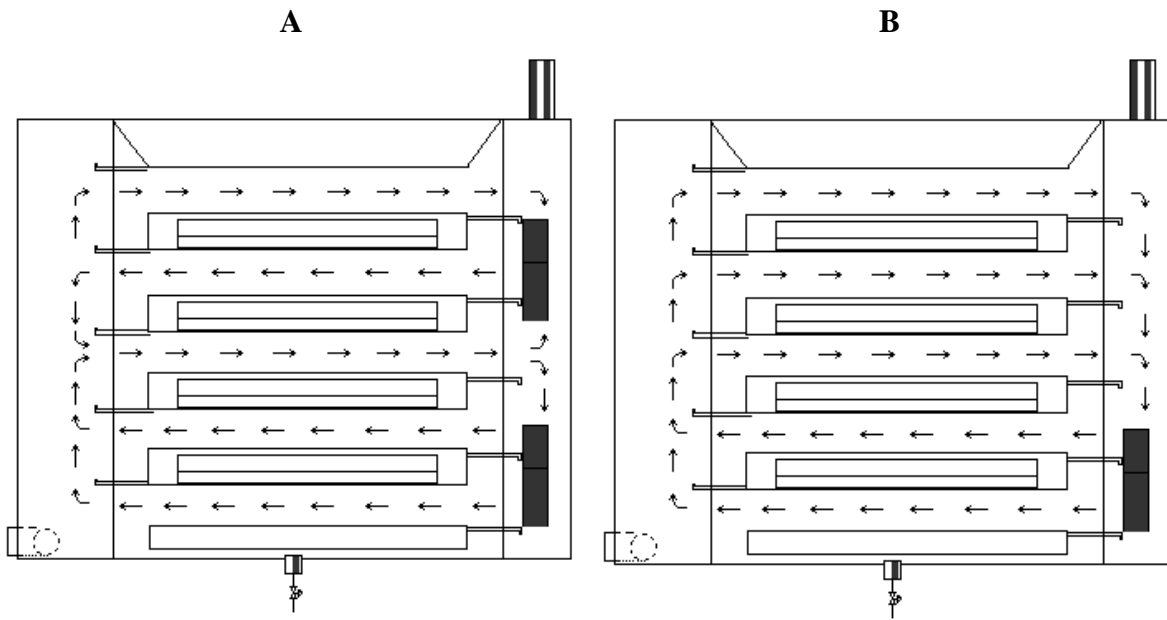
Para incrementar el  $N_{Re}$  en el “headspace” del biorreactor se instaló un sistema de ventiladores al interior que permitió la circulación interna de aire

Para los experimentos en soporte-sustrato fueron empleados dos sistemas de circulación de aire (Fig. 5.5) que consistieron de ventiladores de 12 cm que ofrecían corrientes de aire paralelas a las tapas y bases de las charolas en el interior del reactor. En la Figura 5.5 se muestra el lugar donde fueron colocados los ventiladores y el patrón de flujo de aire observado.

El sistema de circulación de aire “A” consistió de dos ventiladores Nidec® BETA V™ modelo TA450DC de tres aspas, 12 volts DC y 0.28 A; el sistema de ventilación “B” consistió de un ventilador PROAM® modelo VN6-117M de 5 aspas, 120 volts AC y 0.21 A. El sistema de ventilación “A” permitió alcanzar una velocidad ( $v_{aire}$ ) promedio del aire en el “headspace” de  $0.76 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  que se traduce en un  $N_{Re}$  igual a 4330. Por otro lado el sistema de ventilación “B” permitió alcanzar una  $v_{aire}$  igual a  $1.52 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  con un  $N_{Re}$  igual a 8631.

Para el caso de los experimentos en soporte inerte solo se uso el sistema de circulación de aire “A” con ventiladores Sensflow® DC Brushlees, Modelo WFC1212B, 12 volts DC y 0.44 A, con 7 aspas. Este sistema alcanzó una velocidad promedio ( $v_{aire}$ ) de  $0.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  con un  $N_{Re}$  de 2839. En la Figura 5.5 se muestra el lugar donde fueron colocados los ventiladores y el patrón de flujo de aire observado.





**Figura 5.5** Sistemas de ventilación. A: dos ventiladores; B: un ventilador.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presenta el balance de calor y masa (agua) empleado en la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) utilizados en el modelo matemático desarrollado para llevar a cabo las predicciones de los perfiles de la temperatura y contenido de humedad del lecho de fermentación. El modelo matemático desarrollado fue validado comparando sus predicciones con los datos experimentales obtenidos durante las fermentaciones. Por último se presentan los resultados experimentales obtenidos al estudiar los efectos de las variables de operación (altura del lecho y circulación interna del aire) tanto en los experimentos con soporte-sustrato como en soporte inerte.

### 6.1 Balances de materia y energía

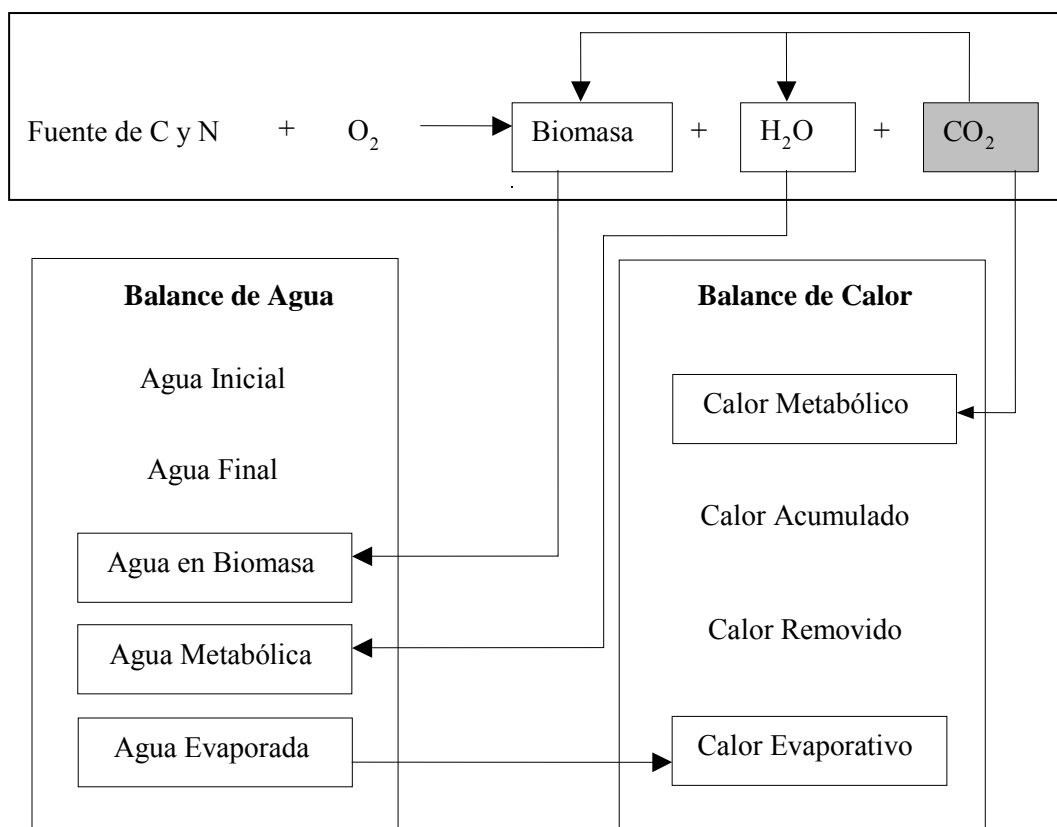
A fin de desarrollar el modelo, fueron propuestos balances de energía, de masa y el balance estequiométrico de la biorreacción para el crecimiento de *Aspergillus niger*. La Figura 6.1 muestra los balances propuestos y las relaciones generales entre algunos de sus componentes y también muestra la importancia central que tiene la medición de CO<sub>2</sub> en los tres balances, por lo que su medición precisa es esencial. La medición en línea de CO<sub>2</sub> fue usada para estimar la generación de agua metabólica, la producción de biomasa y la generación de calor metabólico. La concentración de biomasa fue usada para estimar el contenido de agua de la biomasa. La Tabla 6.1 presenta todas las variables y parámetros involucrados en el modelo.

Las principales suposiciones consideradas en el modelo matemático fueron:

- i. Fue definida una biorreacción para el crecimiento de *Aspergillus niger* bajo condiciones de FMS y se realizó el balance estequiométrico para la misma.
- ii. Fueron considerados los gradientes de temperatura y humedad en el sistema de fermentación.
- iii. La evaporación ocurre desde la superficie de los lechos de fermentación.

- iv. Las propiedades físicas (excepto para el calor latente de vaporización) son independientes de la temperatura y permanecen constantes durante las fermentaciones.
- v. Entradas y salidas de aire están saturadas de vapor de agua (esto fue confirmando por medio de mediciones durante las fermentaciones).
- vi. Los coeficientes de rendimiento para la biorreacción permanecen constantes durante el cultivo.
- vii. El modelo solo es válido cuando la temperatura del lecho de fermentación ( $T_b$ ) es mayor que la temperatura del aire de alimentación ( $T_a$ ).

### Balance Estequiométrico de la Biorreacción



**Figura 6.1** Diagrama esquemático de las relaciones entre los balances propuestos.

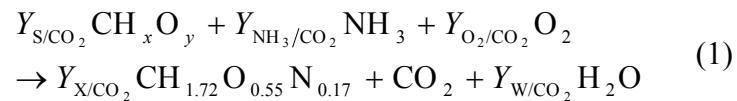
**Tabla 6.1.** Notación, unidades y valores de los parámetros utilizados en los balances y el modelo.

Símbolo	Descripción	Valor y unidades	Fuente o referencia
$A_c$	Área específica de transferencia de calor	$m^2$	Variable de operación
$A_T$	Área total transversal al flujo de aire	$710 \text{ cm}^2$	Variable de operación
$CO_2$	$CO_2$ producido	$\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Variable de operación
$CO_{2\text{max}}$	Máximo $CO_2$ producido	$\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Variable de operación
$Cp_b$	Capacidad calorífica del lecho de fermentación	$2.568 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Calculado
$G$	Flujo volumétrico de aire	$\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$	Variable de operación
$H_a$	Contenido de humedad en el aire que fluye	$\text{g/g}$ aire seco	Estimado usando $T_a$
$H_{a,0}$	Contenido de humedad inicial en aire que fluye, modelo	$\text{g/g}$ aire seco	Estimado usando $T_a$
$h_c$	Coefficiente de transferencia de calor de la charola	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$	Estimado por balance de energía
$H_s$	Contenido de humedad en aire superficie del lecho	$\text{g/g}$ aire seco	Estimado usando $T_b$
$H_{s,0}$	Cont. de humedad inicial, aire superficie lecho modelo	$\text{g/g}$ aire seco	Estimado usando $T_b$
$k_b$	Conductividad del lecho de fermentación	$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Calculado
$k_m$	Coefficiente convectivo de transferencia de masa	$\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Estimado por balance de agua
$L$	Longitud de la charola paralela al flujo de aire	$12.3 \text{ m}$	Variable de operación
$m_b$	Masa de soporte inerte	$\text{g}_{\text{is}}$	Variable de operación
$MW_{CO_2}$	Peso molecular del $CO_2$	$44.01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Conocido
$MW_W$	Peso molecular del agua	$18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Conocido
$MW_X$	Peso molecular de la biomasa	$24.9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Nielsen y col., 2003
$PMS$	Pérdida de materia seca	$\text{g}$	Variable medida
$Q_{\text{acum}}$	Calor acumulado en el lecho de fermentación	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Medido por $T_b$
$Q_{\text{evap}}$	Calor removido por evaporación de agua	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Estimado por balance de agua
$Q_{\text{met}}$	Calor metabólico generado	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Calculado por $CO_2$ producido
$Q_{\text{sen,b}}$	Calor sensible transferido desde fondo de la charola	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Estimado por balance de energía
$Q_{\text{sen,est}}$	Calor sensible transferido de la charola, estimado	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Estimado por modelo
$Q_{\text{sen,exp}}$	Calor sensible transferido de la charola, experimental	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Calculado por balance
$Q_{\text{sen,t}}$	Calor sensible transferido desde superficie de la charola	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Estimado por balance de energía
$r_{CO_2}$	Tasa de producción de $CO_2$	$\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Variable medida
$T_a$	Temperatura del aire que fluye	$^{\circ}\text{C}$	Variable de operación
$T_{a,0}$	Temperatura inicial del aire que fluye del modelo	$30^{\circ}\text{C}$	Parámetro del modelo
$T_b$	Temperatura del lecho de fermentación	$^{\circ}\text{C}$	Variable de operación
$T_{b,0}$	Temperatura inicial del lecho de fermentación, modelo	$30^{\circ}\text{C}$	Parámetro del modelo
$T_{\text{out}}$	Temperatura del aire a la salida del biorreactor	$^{\circ}\text{C}$	Variable de operación
$T_s$	Temperatura de la superficie del lecho de fermentación	$^{\circ}\text{C}$	Variable de operación
$U_b$	Coefficiente global de transferencia de calor del lecho	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$	Despreciado, balance de energía
$U_t$	Coefficiente global de transferencia de calor de la charola	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$	Estimado por balance de energía
$V$	Velocidad del aire que fluye paralelo a charola	$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	Variable de operación
$W_{b,i}$	Contenido de agua inicial en el lecho de fermentación	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Medido
$W_{b,j}$	Contenido de agua final en el lecho de fermentación	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Medido
$W_{\text{evap,est}}$	Agua evaporada, estimada	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Estimado por modelo
$W_{\text{evap,exp}}$	Agua evaporada, experimental	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Calculado por balance de agua
$W_{\text{evap,i,j}}$	Agua evaporada	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Estimado por balance de agua
$W_{\text{met,i,j}}$	Agua metabólica	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{is}}^{-1}$	Calculado por $CO_2$ producido
$x_{\text{IS}}$	Fracción másica de soporte inerte	$0.4025$	Medido
$Y_{\text{NH}_3/\text{CO}_2}$	Coefficiente de rendimiento para amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) - $CO_2$	$\text{mol} \text{ NH}_3 \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Calculado por estequiometría
$Y_{\text{O}_2/\text{CO}_2}$	Coefficiente de rendimiento para oxígeno ( $\text{O}_2$ ) - $CO_2$	$\text{mol} \text{ O}_2 \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Calculado por estequiometría
$Y_{\text{S}/\text{CO}_2}$	Coefficiente de rendimiento para sustrato (S) - $CO_2$	$\text{Cmol S} \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Supuesto
$Y_{\text{X}/\text{CO}_2}$	Coefficiente de rendimiento para biomasa (X) - $CO_2$	$\text{Cmol X} \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Supuesto
$Y_{\text{X}/\text{S}}$	Coefficiente de rendimiento biomasa (X) - sustrato (S)	$\text{Cmol X} \cdot \text{mol} \text{ S}^{-1}$	Medido
$Y_{\text{W}/\text{CO}_2}$	Coefficiente de rendimiento para agua (W) - $CO_2$	$\text{mol W} \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Calculado por estequiometría
$z_b$	Altura del lecho de fermentación	$\text{m}$	Variable de operación
$\alpha$	Calor producido por mol de $CO_2$ generado	$460 \times 10^3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$	Nielsen y col., 2003
$\lambda_w$	Calor latente de vaporización del agua	$\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$	Himmelblau, 1996
$\mu_{\text{air}}$	Viscosidad del aire en el "headspace" del biorreactor	$1.863 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Perry y col., 1999
$\mu_{\text{CO}_2}$	Tasa específica de producción de $CO_2$	$\text{h}^{-1}$	Calculado
$\rho_{\text{air}}$	Densidad del aire en el "headspace" del biorreactor	$0.00086 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$	Perry y col., 1999

### 6.1.1 Balance estequiométrico

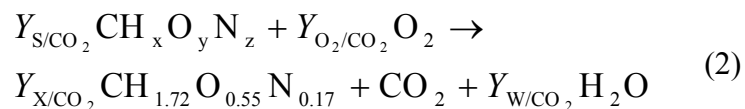
Como ha sido señalado en trabajos relacionados (Smits y col., 1999; Khanahmadi y col., 2004; Gutiérrez-Rojas y col., 1995) los coeficientes de rendimiento pueden ser obtenidos a partir de modelos estequiométricos específicos mediante balances elementales.

Se puede proponer una biorreacción como la presentada en la Ec. (1) para estimar los coeficientes de rendimiento mediante un balance estequiométrico para el crecimiento de *A. niger* bajo condiciones de FMS en el biorreactor de charolas. Asumiendo la composición elemental promedio de *A. niger* como  $\text{CH}_{1.72}\text{O}_{0.55}\text{N}_{0.17}$  (Nielsen y col., 2003), los coeficientes de rendimiento pueden ser expresados en base C-mol, de tal manera que:



La ecuación anterior puede ser útil cuando se conoce la naturaleza del sustrato, como en el caso de un soporte inerte impregnado con medio definido, los valores de los subíndices  $x$  y  $y$  pueden ser conocidos. Si se conocen estos valores y se aplican balances elementales a la Ec. (1) se obtiene un sistema algebraico subestimado, ya que hay cinco rendimientos desconocidos, pero solo cuatro elementos para los balances elementales. A fin de tener un sistema algebraico bien definido uno de los coeficientes de rendimiento debe ser medido independientemente.

Cuando se emplea un sustrato complejo, como el caso de un residuo agro-industrial se puede proponer una biorreacción como la Ec. (2). Asumiendo la misma composición para el microorganismo descrita arriba. Los coeficientes de rendimiento pueden ser expresados en base C-mol, de tal manera que:



La Ec. (2) también puede ser útil cuando se conoce la composición elemental del sustrato (x, y, z), aunque esto presenta dificultades debido a su naturaleza y a la variabilidad que puede presentar su composición. Sin embargo, pueden hacerse algunas suposiciones para poder aplicar balances elementales a la Ec. (2). Una vez que se conoce la composición elemental del sustrato, se obtiene un sistema algebraico bien definido. Todos los coeficientes de rendimiento pueden ser obtenidos algebraicamente. No es necesario realizar estimaciones ni determinaciones.

Una vez que se ha definido el balance estequiométrico de la ecuación de biorreacción, se pueden estimar o calcular el consumo o producción de sus elementos a partir de la medición de uno de ellos. El CO<sub>2</sub> puede ser medido experimentalmente y su comportamiento puede ser simulado a través de modelos matemáticos conocidos, como el modelo Logístico (Ec. 3) o el modelo de Gompertz (Ec. 4), dependiendo de las características de la fermentación y del ajuste entre los datos experimentales y los obtenidos por tales modelos. En las Ecs 3 y 4 son mostrados los modelos en su forma integral, que fue la empleada en la realización de los ajustes.

$$r_{CO_2} = \mu_{CO_2} \cdot CO_2 \left( 1 - \frac{CO_2}{CO_{2\max}} \right) \quad (3)$$

$$r_{CO_2} = CO_{2\max} \cdot \beta \cdot \mu_{CO_2} \cdot e^{-\beta \cdot e^{-\mu_{CO_2} \cdot t}} \cdot e^{-\mu_{CO_2} \cdot t} \quad (4)$$

La formulación de ecuaciones de reacción en FMS usando residuos agro-industriales es necesaria principalmente por tres razones: (1) La medición de la biomasa formada en procesos de FMS presenta complicaciones, principalmente en soportes que sirven como sustrato (Mitchell, 1992), no así en soportes inertes como PUF o agrolita (Ooijkas y col., 2000), (2) no es posible medir la producción real de agua metabólica en los procesos de FMS y (3) tampoco es posible describir todas las reacciones exotérmicas llevadas a cabo por el microorganismo. Estas razones justifican la estimación de la biomasa formada, del agua metabólica y generación de calor metabólico a partir de la medición del CO<sub>2</sub> producido.

### 6.1.2 Balance de agua

La FMS en biorreactores de charola es un proceso por lote bajo estado no estacionario, el contenido de agua final es el resultado de el contenido de agua inicial más el agua producida por metabolismo menos el agua evaporada. La ecuación básica del balance integral de agua en el lecho sólido, para cualquier tiempo entre muestreo, puede ser escrita como sigue:

$$W_{\text{evap},i,j} = W_{b,i} - W_{b,j} + W_{\text{met},i,j} \quad (5)$$

Donde  $W_{b,i}$  y  $W_{b,j}$  representan el contenido de agua del lecho de fermentación expresados como gramos de agua por gramo de soporte inerte seco y corresponden al contenido inicial y final en el lecho sólido;  $W_{\text{evap},i,j}$  y  $W_{\text{met},i,j}$  corresponden a la masa de agua evaporada y la generada metabólicamente, por gramo de soporte inerte en cualquier intervalo de tiempo, respectivamente.  $W_{\text{met},i,j}$  es calculada mediante la siguiente ecuación:

$$W_{\text{met},i,j} = M_{w_w} \cdot Y_{w/\text{CO}_2} \cdot \int_i^j r_{\text{CO}_2} \quad (6)$$

Donde  $M_{w_w}$  es el peso molecular del agua,  $Y_{w/\text{CO}_2}$  es el coeficiente de rendimiento para la generación de agua metabólica y  $r_{\text{CO}_2}$  es la tasa de producción de  $\text{CO}_2$  expresada como mol por hora por gramo de agrolita.

Considerando que la evaporación de agua del lecho de fermentación es un proceso de secado y que el contenido de humedad del lecho de fermentación es más grande que el contenido crítico de humedad, entonces la evaporación puede ser escrita como (McCabe y col., 2000).

$$W_{\text{evap},i,j} = k_m A_c \int_i^j (H_s - H_a) dt \quad (7)$$

Donde  $k_m$  es el coeficiente convectivo de transferencia de masa para el agua.  $A_c$  es el área específica de transferencia de masa,  $H_a$  y  $H_s$  representan el contenido de humedad en el

flujo aire a la entrada y del aire sobre la superficie del lecho de fermentación, respectivamente. Estos valores fueron calculados con las mediciones de temperatura usando la carta psicrométrica, asumiendo que la temperatura en la superficie es igual a la temperatura en el centro del lecho de fermentación.

Aplicando la Ec. (7) y  $W_{\text{evap}}$  (Ec. 5) para cada intervalo de muestreo, que incluso puede comprender solo el valor inicial y final, permiten la estimación numérica (función “Solver” de Microsoft Excel) del coeficiente convectivo de transferencia de masa ( $k_m$ ) de la superficie del lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor.

Los cambios en el contenido de agua del lecho de fermentación ( $W_b$ ) dependen de la generación de agua metabólica y de la tasa de evaporación y pueden estimarse mediante la siguiente ecuación:

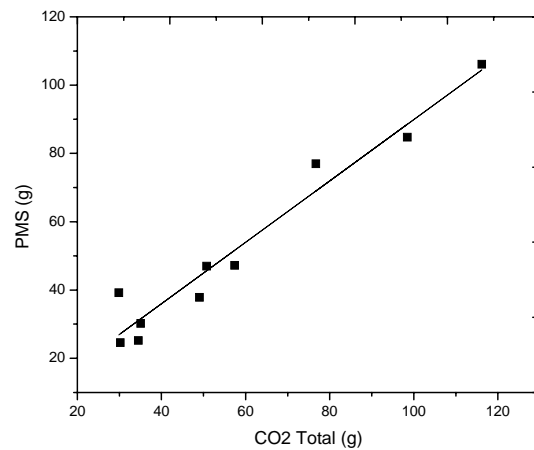
$$\frac{dW_b}{dt} = M_{W_w} \cdot Y_{W/CO_2} \cdot r_{CO_2} - k_m A_c (H_s - H_{a,0}) \quad (8)$$

Para el caso del soporte-sustrato es necesario considerar la pérdida de materia seca ( $PMS$ ) del lecho de fermentación de tal manera que:

$$PMS = -0.8991 \cdot m_{si} \cdot CO_2 \cdot M_{W_{CO_2}} \quad (9)$$

La pendiente de la Ec. 9 es determinada a partir de los datos experimentales de  $CO_2$  total y  $PMS$  medidos durante la fermentación (Figura 6.2).



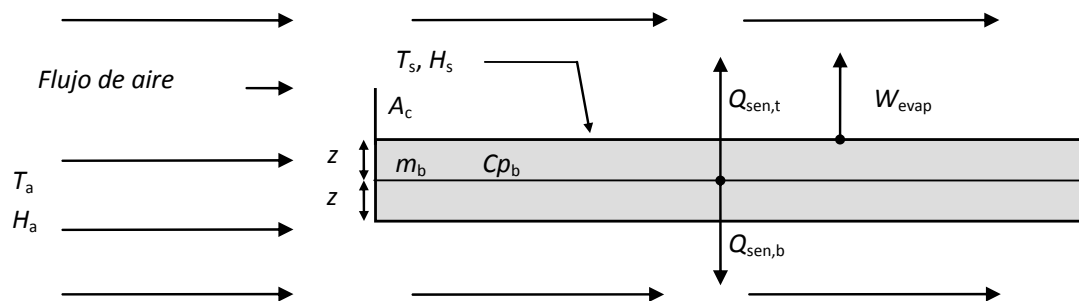


**Figura 6.2** Pérdida de materia seca vs CO<sub>2</sub> total en los estudios con soporte-sustrato.

Como se observa en la Figura 6.2 existe una correlación lineal ( $R^2 = 0.9517$ ) entre la *PMS* y el CO<sub>2</sub> total en los estudios con soporte-sustrato.

### 6.1.3 Balance de energía

La transferencia de calor desde el lecho de fermentación en cada charola hacia el aire que fluye en los alrededores (“heapspace”) sigue por lo menos tres mecanismos (Fig. 6.3):



**Figura 6.3** Diagrama esquemático de mecanismos de transferencia de calor en la charola de fermentación.

1. Evaporación de agua desde la superficie del lecho de fermentación.
2. Transferencia de calor sensible por conducción y convección desde la superficie del lecho de fermentación.
3. Transferencia de calor sensible por conducción y convección desde el fondo de la charola.

El balance global de energía para cualquier intervalo de tiempo puede ser escrito como:

$$Q_{\text{acum}} = -Q_{\text{sen,t}} - Q_{\text{sen,b}} - Q_{\text{evap}} + Q_{\text{met}} \quad (10)$$

Los elementos de la ecuación (10) son detallados en la Figura 6.1, donde  $Q_{\text{acum}}$  es la acumulación de calor positiva (o negativa) causada por el aumento (o descenso) de la temperatura del lecho de fermentación,  $T_b$ ,  $Q_{\text{sen,t}}$  y  $Q_{\text{sen,b}}$  son el calor removido a través de la superficie y del fondo del lecho de fermentación y depende de los coeficientes globales de transferencia de calor ( $U_t$  y  $U_b$ , respectivamente), la diferencia de temperaturas en el sistema ( $T_b - T_a$ ) y el área de transferencia de calor ( $A_c$ ).  $Q_{\text{evap}}$  es el calor removido por evaporación de agua desde la superficie del lecho de fermentación.  $Q_{\text{met}}$  es la generación de calor metabólico que puede ser relacionada con la tasa de producción de  $\text{CO}_2$ . Usando estas definiciones en la Ec. (9), el balance de energía puede ser expresado como:

$$\frac{Cp_b}{x_{\text{IS}}} \frac{dT_b}{dt} = -U_t A_c (T_b - T_a) - U_b A_c (T_b - T_a) - \lambda_w k_m A_c (H_s - H_a) + \frac{\alpha}{m_b} r_{\text{CO}_2} \quad (11)$$

Donde se tiene:

$$U_b = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b}} \quad (12)$$

$$U_t = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b} + \frac{z_t}{k_t}} \quad (13)$$

Suponiendo que la resistencia térmica del aluminio en las charolas es despreciable debido a su gran conductividad,  $U_t$  y  $U_b$  son iguales y definidos como:

$$U_b = U_t = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b}} \quad (14)$$

Esta suposición permite agrupar los dos elementos de  $Q_{\text{sen}}$  de la Ec. (11) en solo uno.

La integración de la Ec. (11) para cada intervalo de tiempo entre muestreo, que puede estar comprendido únicamente por los valores inicial y final, permite la estimación numérica (función “Solver” de Microsoft Excel) del coeficiente global de transferencia de calor de la charola al “headspace” del biorreactor,  $U_t$ .

La temperatura del lecho de fermentación ( $T_b$ ) fue estimada como sigue:

$$\frac{dT_b}{dt} = \frac{1}{Cp_b / x_{1S}} \left[ -2U_t A_c (T_{b,0} - T_{a,0}) - \lambda_w k_m A_c (H_{s,0} - H_{a,0}) + \frac{\alpha}{m_b} r_{\text{CO}_2} \right] \quad (15)$$

$T_{b,0}$  y  $T_{a,0}$  son los valores iniciales de temperatura (30° C) del lecho de fermentación y de la entrada de flujo de aire, respectivamente, usados en este modelo.  $H_{s,0}$  y  $H_{a,0}$  son los valores iniciales de contenido de humedad del aire para la superficie del lecho de fermentación y del flujo de aire, respectivamente.

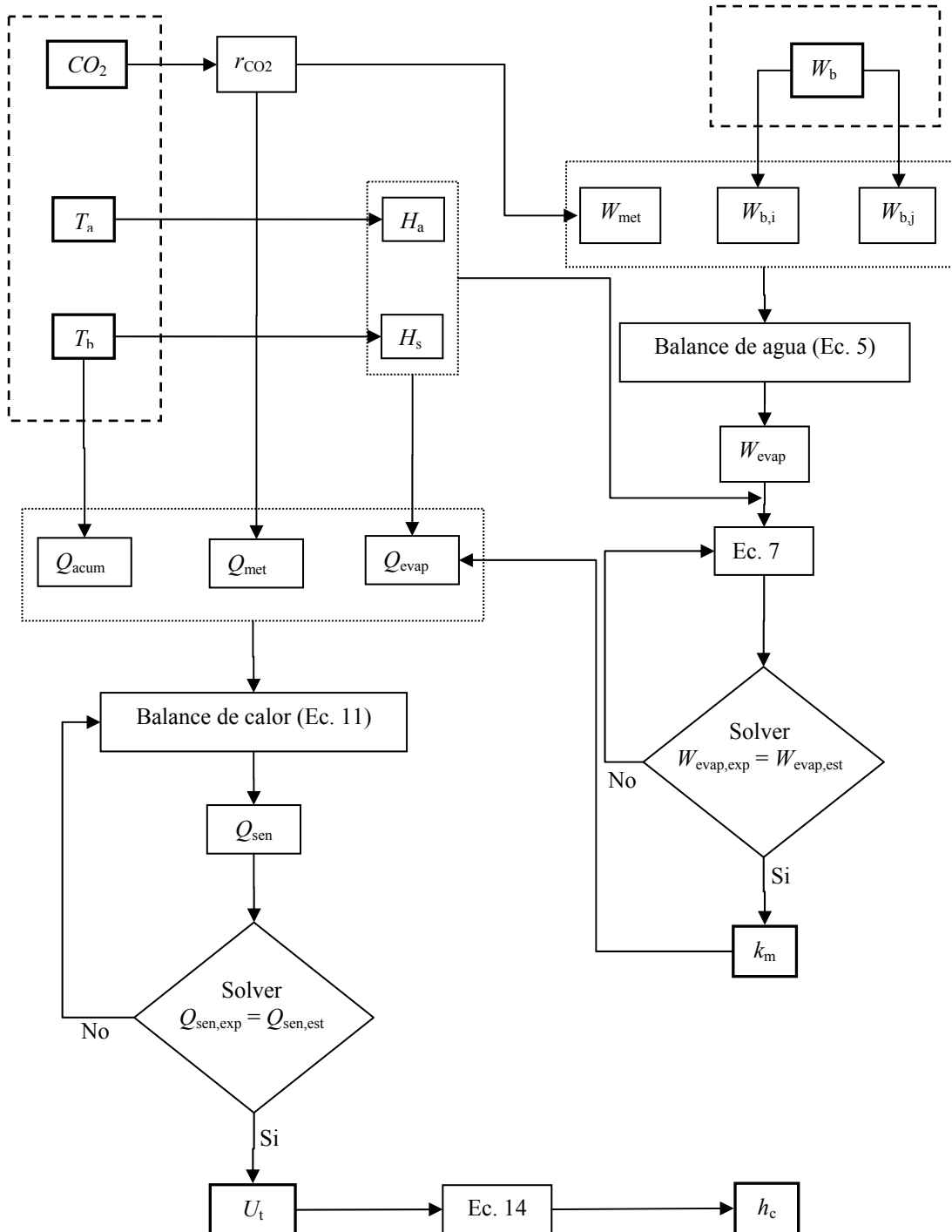
A partir de los balances de agua y energía, las ecuaciones diferenciales ordinarias permiten la simulación de la temperatura y del contenido de humedad del lecho de fermentación en el biorreactor de charolas. El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias

fue resuelto usando el algoritmo “Runge-Kutta.Fehlberg (RKF56) del software Polymath<sup>®</sup> Versión 6.0.

Para los balances de materia y energía realizados fueron considerados los principales mecanismos de remoción de calor. Los balances de energía fueron asociados a una biorreacción estequiométrica propuesta para el crecimiento de *Aspergillus niger*. Estos balances permitieron la estimación de los coeficientes de transferencias de calor y masa (agua) durante el crecimiento del hongo. En la Figura 6.3 se muestran a detalle las variables que deben ser medidas y la forma en que se relacionan los balances de calor y masa (agua). También se muestra la forma en que son estimados los coeficientes de transferencia de calor ( $U_t$  y  $h_c$ ) y de masa ( $k_m$ ).

Mediciones en línea

Mediciones fuera de



**Figura 6.4.** Diagrama esquemático de los balances usados en la estimación del coeficiente global de transferencia de calor ( $U_t$ ) y del coeficiente de transferencia de masa ( $k_m$ ).

A continuación se presentan los estudios realizados sobre soporte-sustrato, así como la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) y la validación del modelo matemático propuesto.

## 6.2 Estudios en soporte-sustrato

El soporte-sustrato utilizado en esta parte experimental fue: 70% de salvado de trigo y 30% de harina de soya. Las condiciones de operación de los diferentes experimentos de FMS llevados a cabo en soporte-sustrato están descritas en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2** Condiciones de operación de FMS con salvado de trigo.

<b>Corrida</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Ventiladores	No	No	No	No	Si	Si	Si
$G$ (cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	170	550	720	1250	1250	2510	1250
$N_{Re}^a$	0.54	1.60	2.4	1.5	4330	4330	8631
$z_b$ (cm)	0.2	0.67	0.91	1.0	1.0	2.0	1.0
$v$ (cm s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	-	-	-	-	76.3	76.3	152
VKgM	1.02	0.93	0.94	3.70	3.68	3.72	3.70
$W_b$ (g·g <sub>IS</sub> <sup>-1</sup> )	0.852	0.852	0.852	0.852	0.852	0.887	0.852
pH	6.70	6.66	6.68	6.81	6.75	6.41	6.55
$a_w$	0.985	0.985	0.988	0.981	0.981	0.984	0.981

<sup>a</sup>En las corridas 1 a 5,  $N_{Re} = L \cdot G \cdot \rho_{air} \cdot (A_T \cdot \mu_{air})^{-1}$ , en la corrida 5 a 7,  $N_{Re} = L \cdot v \cdot \rho_{air} \cdot \mu_{air}^{-1}$ .

<sup>b</sup>En las corridas 1 and 4  $v$  es demasiado baja para ser medida.

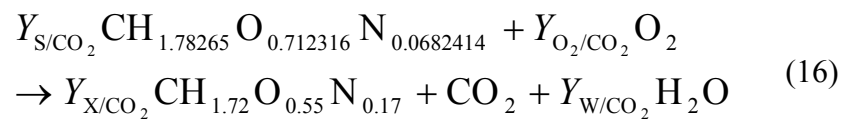
En las corridas 1, 2 y 3 se varió la altura del lecho de fermentación, en 0.2, 0.67 y 0.91 cm respectivamente, el gasto de aire se aumentó consecuentemente a fin de mantener un valor aproximado de 1 VKgM. En los experimentos 4 a 7 se mantuvo el gasto de aire en un valor constante aproximado de 3.7 VKgM; en las corridas 5 y 6 se aumentó la altura del lecho de fermentación en las charolas de 1 a 2 cm, manteniendo constante el  $N_{Re}$  en el “headspace” del biorreactor con el sistema de circulación interna de aire propuesto (ver sección 5.7.3) y el gasto de aire se aumentó consecuentemente a fin de mantener constante el valor de VKgM. En las corridas 4, 5 y 7 se tiene una altura constante del lecho de fermentación (1 cm) variando el

$N_{Re}$  en 1.5, 4330 y 8631 respectivamente, aumentando la convección forzada en el “headspace” del biorreactor, por medio del sistema de ventiladores propuesto.

En esta parte del trabajo experimental, se estimaron los coeficientes de transferencia de calor y de masa (agua), que serán usados más adelante en el modelo matemático propuesto. Se evaluó el efecto de variables de operación, la altura del lecho de fermentación y la circulación interna forzada de aire sobre la transferencia de calor del lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor de charolas. Finalmente, el modelo desarrollado se validó al comparar los valores predichos por el modelo con los valores experimentales obtenidos durante las fermentaciones.

### 6.2.1 Balance estequiométrico

Para el caso de las FMS con soporte-sustrato se asume la siguiente ecuación para el crecimiento de *Aspegillus niger* AT, se consideró crecimiento aerobio sin formación de producto, a partir de la Ec. (2) (ver sección 6.1.1) se tiene:



En la Ec. (16) se asume que la composición elemental de la biomasa es  $CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$  que es la composición promedio para *Aspergillus niger* (Nielsen y col., 2003) y  $CH_{1.78265}O_{0.712316}N_{0.0682414}$  es la composición elemental para el sustrato empleado en la fermentación (ver sección 5.2.1.2). Al aplicar balances elementales a la Ec. (16) se obtiene un sistema algebraico bien definido. En la Tabla 6.3 se muestran los valores y las unidades de los coeficientes de rendimiento obtenidos algebraicamente al realizar los balances elementales sobre la Ec. (16).

**Tabla 6.3** Coeficientes de rendimiento obtenidos a partir de los balances elementales (C, H, O y N) de la ecuación de reacción para el crecimiento de *Aspergillus niger* AT.

Coeficiente de rendimiento	Valor	Unidades
$Y_{S/CO_2}$	1.67062	[Cmol S · mol CO <sub>2</sub> ]
$Y_{O_2/CO_2}$	1.045582	[mol O <sub>2</sub> · mol CO <sub>2</sub> ]
$Y_{X/CO_2}$	0.67062	[Cmol X · mol CO <sub>2</sub> ]
$Y_{W/CO_2}$	0.9123322	[mol W · mol CO <sub>2</sub> ]

Una vez que se conocen todos los coeficientes de rendimiento de la biorreacción y se conoce la cantidad de CO<sub>2</sub> producido se pueden calcular estequiométricamente los demás componentes faltantes de la biorreacción. La cantidad de CO<sub>2</sub> producido fue medida en línea por medio de un metabolímetro. La tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> para los experimentos con soporte-sustrato fue obtenida usando el modelo que Gompertz (Ec. 4) ya que presentó mejor ajuste que la ecuación del modelo Logístico (Ec. 3).

### 6.2.2 Estimación de los coeficientes de transferencia de masa y calor

Las mediciones del contenido de agua inicial y final ( $W_{b,0}$ ,  $W_{b,f}$ ) y la producción total de agua metabólica en el lecho de fermentación fueron usadas para calcular el agua evaporada total de cada fermentación en las condiciones experimentales evaluadas. Como se observa en la Ec. (6)  $Y_{W/CO_2}$  fue usado para determinar la producción de agua metabólica con una función que involucró la producción de CO<sub>2</sub> (ver sección 6.1.2).

Con el valor de la masa de agua evaporada total,  $W_{evap}$  en cada fermentación y el calor latente de vaporización, se calculó el calor empleado en la evaporación de agua ( $Q_{evap}$ ) del lecho de fermentación (ver sección 6.1.3).



Las Tablas 6.4, 6.5 y 6.6 muestran los valores de los elementos de los balances de calor y masa (agua) y de los coeficientes de transferencia de calor ( $U_t$  y  $h_c$ ) y de masa ( $k_m$ ) obtenidos para las corridas realizadas en las condiciones señaladas en la Tabla 6.2.

Durante las fermentaciones en soporte-sustrato, no fue posible tomar muestras durante la fermentación para mantener condiciones asépticas en el cultivo. Por lo que solo se realizó un balance de masa (agua) que consideró el valor inicial y final del contenido de humedad del lecho de fermentación y un balance de calor para estimar el valor total del calor sensible ( $Q_{sen}$ ) en cada corrida, para la determinación de los coeficientes totales de transferencia de calor y masa (agua) del lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor.

### **6.2.3 Efecto de las variables de operación**

En los experimentos realizados en el biorreactor de charolas para FMS usando el soporte-sustrato, se evaluó el efecto de dos de las principales variables de operación que tienen un efecto importante en la escala y desempeño de este tipo de biorreactores: i) altura del lecho y ii) la circulación interna forzada de aire.

#### **6.2.3.1 Efecto de la altura del lecho de fermentación**

La altura del lecho de fermentación y el número de las charolas durante un proceso son las únicas formas de escalar razonablemente los procesos de FMS en biorreactores de charola.

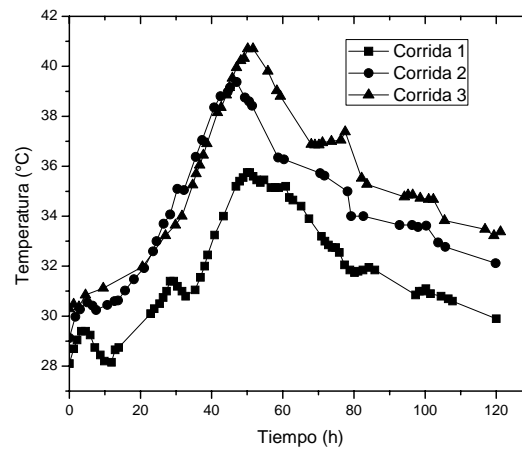
En la Tabla 6.4 y 6.5 se observa el efecto de la altura del lecho de fermentación, al comparar los resultados de las corridas 1, 2 y 3, cuyas condiciones experimentales fueron mostradas en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.4** Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.

	Corrida		
	1	2	3
Altura del lecho (cm)	0.2	0.67	0.91
$N_{Re}$	0.54	1.76	2.31
$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.057	0.101	0.100
$U_t$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	0.573	0.667	0.645
$h_c$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	0.577	0.687	0.670
$Q_{met}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> )	3614.41	2863.23	2605.86
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-1036.85	-896.97	-806.28
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-2493.23	-1955.83	-1784.83
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.428	0.371	0.334
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-0.117	0.066	0.090
$W_{met}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> )	0.123	0.098	0.088

En la Tabla 6.4 se puede observar que el aumento en la altura del lecho ocasiona un aumento en el coeficiente de transferencia de masa ( $k_m$ ). Esto se debe a que el aumento en la temperatura del lecho ocasiona mayor evaporación de agua del mismo. Por otro lado, se observa que el coeficiente global de transferencia de calor ( $U_t$ ), disminuyó al incrementar la altura del lecho de 0.67 a 0.91 cm, debido a que como se observa hubo evaporación de agua en el lecho de fermentación, mientras que con una altura del lecho de 0.2 cm se observa que la cantidad de agua metabólica es mayor a la cantidad de agua perdida en el lecho de fermentación. Por lo que los coeficientes de transferencia de calor y masa pueden no haber sido estimados adecuadamente.

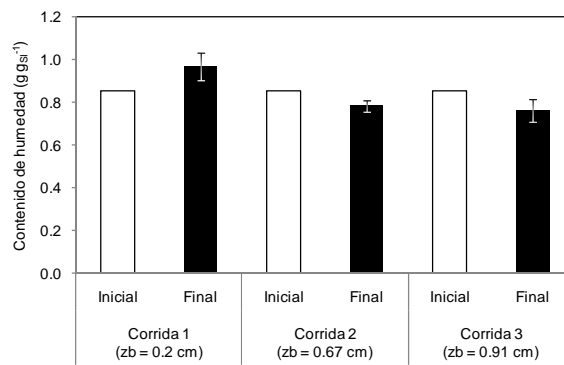
En la Figura 6.5 se muestra el efecto de la altura del lecho de las corridas 1, 2 y 3 sobre la temperatura del lecho de fermentación.



**Figura 6.5** Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas 1, 2 y 3.

Se puede observar que al aumentar la altura del lecho aumenta la acumulación de calor, provocando un aumento en el perfil de temperaturas observadas durante la fermentación debido a que el aumento en la altura del lecho disminuye el coeficiente global de transferencia de calor como se expresa en la Ecs 12 a 14. La mayor altura del lecho alcanzó una temperatura de 41° C que es mayor a la observada para la menor altura del lecho que fue de 36° C.

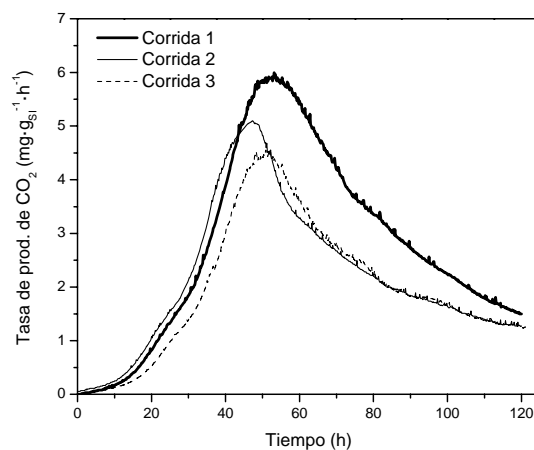
En la Figura 6.6 se presenta el efecto de la altura del lecho sobre el contenido de humedad final del lecho de fermentación para las corridas 1, 2 y 3.



**Figura 6.6** Contenido de humedad inicial y final en el lecho de fermentación para las corridas 1, 2 y 3.

En la Figura 6.6 se observa que al aumentar la altura del lecho disminuye el contenido de humedad final en los lechos de fermentación esto se debe a que aumentan los coeficientes de transferencia de masa (agua) ocasionando mayor pérdida de agua del lecho de fermentación, además el aumento de temperaturas ocasiona mayor evaporación de agua.

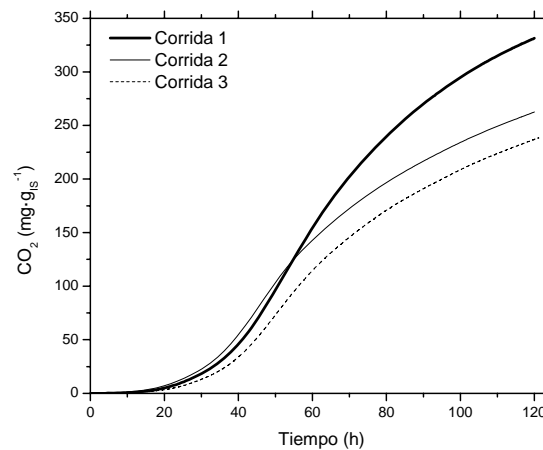
En la Figura 6.7 se presenta el efecto de la altura del lecho sobre las tasas de producción de CO<sub>2</sub> para las corridas 1, 2 y 3.



**Figura 6.7** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> de las corridas 1, 2 y 3.

Para las corridas 1, 2 y 3 se observa un comportamiento similar para el perfil de tasas de producción de CO<sub>2</sub> en las primeras 40 h de fermentación. Al aumentar la altura del lecho de 0.2 a 0.91 cm se observa un efecto negativo sobre las tasas de producción de CO<sub>2</sub> por la mayor acumulación de calor en el lecho de fermentación que afecta negativamente el metabolismo microbiano.

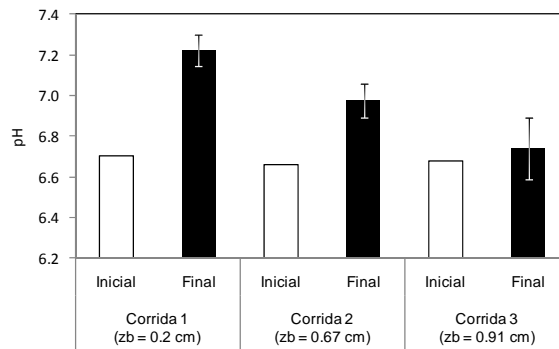
En la Figura 6.8 se presenta el efecto de la altura del lecho de fermentación sobre los perfiles de producción de CO<sub>2</sub>.



**Figura 6.8** Perfiles de producción de CO<sub>2</sub> para las corridas 1, 2 y 3.

Se observa que la producción de CO<sub>2</sub> por g de soporte inerte decrece de la corrida 1 a la corrida 3 por la acumulación de calor en el lecho de fermentación y sus efectos negativos en el metabolismo microbiano. Para todos los casos el modelo que mejor ajustó a los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> medidos fue el modelo de Gompertz con  $R^2 > 0.9985$ .

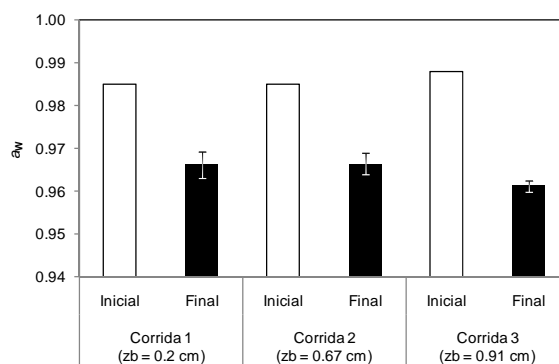
En la Figuras 6.9 y 6.10 se muestra el efecto de la altura del lecho de fermentación en el pH y  $a_w$ .



**Figura 6.9** pH inicial y final para las corridas 1, 2 y 3.

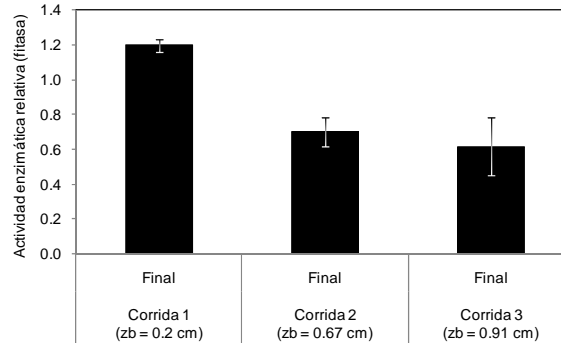
Para las corridas 1, 2 y 3 el pH final aumenta, observándose un mayor aumento del pH en el corrida 1 que va de un pH de 6.7 a 7.2, esto puede ser posible por la desaminación de compuestos amino orgánicos presentes en el medio que son usados durante el crecimiento del microorganismo. Además se observa que al aumentar la altura del lecho de fermentación aumenta su temperatura lo que disminuye el metabolismo microbiano afectando el pH.

Se observa para todas las corridas ensayadas que la  $a_w$  final disminuye como resultado del metabolismo microbiano sin embargo no se observa un efecto significativo de la altura del lecho sobre la  $a_w$  (Fig. 6.10).



**Figura 6.10** Actividad de agua inicial y final para las corridas 1, 2 y 3.

En la Figura 6.11 se presenta el efecto de la altura del lecho sobre la actividad enzimática relativa de la fitasa.



**Figura 6.11** Actividad enzimática relativa de la fitasa para las corridas 1, 2 y 3.

Se observa una disminución de la actividad enzimática relativa de la fitasa al aumentar la altura del lecho de fermentación que como se observó anteriormente esto ocasiona mayor acumulación de calor en el lecho de fermentación (ver Figura 6.5).

También se puede observar el efecto de la altura del lecho de fermentación al comparar los resultados obtenidos en las corridas 5 y 6 (Tabla 6.5) en donde en ambos experimentos se empleó circulación interna de aire por convección forzada ( $N_{Re} = 4330$ ).

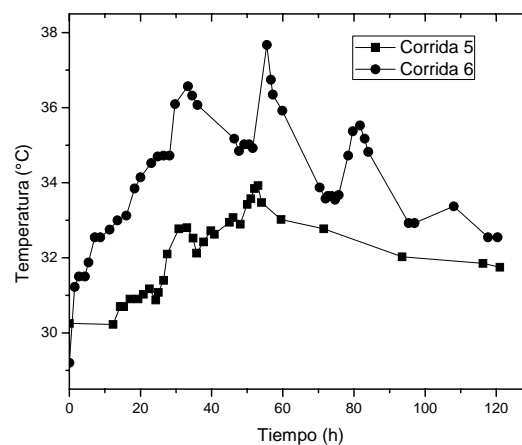
**Tabla 6.5** Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.

	Corrida	
	5	6
<b>Altura del lecho (cm)</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>
$N_{Re}$	<b>4330</b>	<b>4330</b>
$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.395	0.264
$U_i$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	0.746	0.929
$h_c$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	0.783	1.053
$Q_{met}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> )	2028.10	1756.08
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-1018.47	-751.00
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-932.95	-997.36
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.420	0.310
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	0.270	0.154
$W_{met}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> )	0.070	0.060

En las corridas 5 y 6 se observa que al aumentar la altura del lecho de fermentación disminuye el coeficiente de transferencia de masa ( $k_m$ ). Esto se debe a que hay más remoción de calor sensible por efecto de la circulación interna de aire y además que la mayor altura del lecho de fermentación aumenta la resistencia a la transferencia de masa desde el fondo del lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor. El mismo comportamiento se observa para  $U_t$  al aumentar la altura del lecho de fermentación. Esto puede deberse a que al duplicar la altura del lecho también se duplica la alimentación de aire al reactor que combinado con la circulación interna de aire, mejora la transferencia de calor del lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor.

Aunque el aire suministrado al lecho de fermentación tiene un alto contenido de humedad, la generación de agua metabólica no alcanzó para sustituir el agua removida del lecho por evaporación. Esto contrasta con lo reportado por Smits y col. (1999).

En la Figura 6.12 se muestra el efecto de la altura del lecho de las corridas 5 y 6 sobre la temperatura de fermentación del lecho.

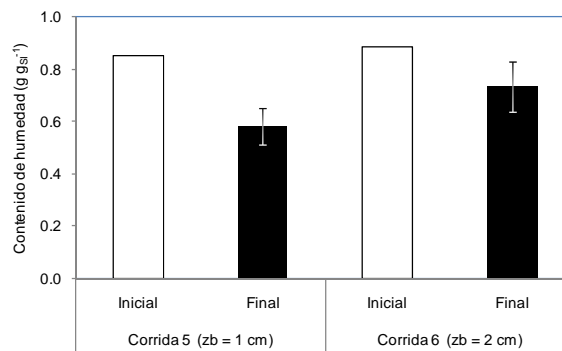


**Figura 6.12** Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas 5 y 6.



Se observa el mismo comportamiento que el de las corridas 1, 2 y 3 donde al aumentar la altura del lecho aumenta la acumulación de calor, ocasionando un aumento en la temperatura del lecho de fermentación. Las fluctuaciones mostradas en la Figura 6.12 que comprenden periodos de 24 h se deben a las variaciones de temperatura registradas en el aire suministrado al biorreactor y a la magnitud del flujo de aire suministrado.

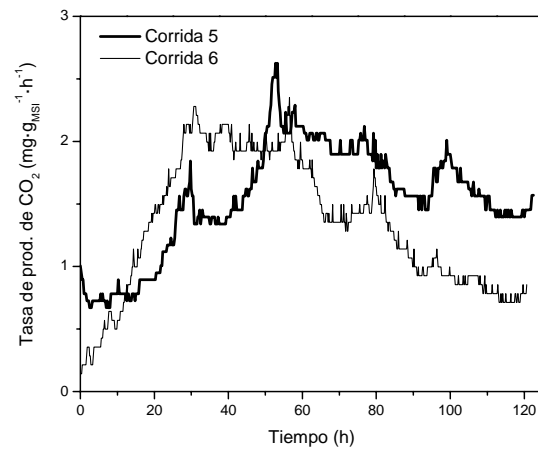
En la Figura 6.13 se presenta el efecto de la altura del lecho sobre el contenido de humedad final del lecho de fermentación para las corridas 5 y 6.



**Figura 6.13** Contenido de humedad inicial y final en el lecho de fermentación para las corridas 5 y 6.

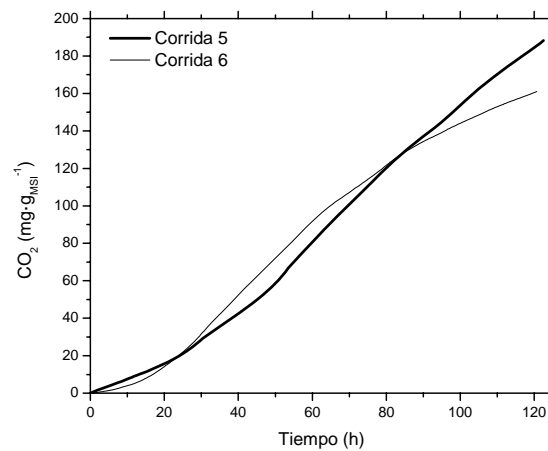
En las corridas 5 y 6 se observa un comportamiento opuesto al observado en las corridas 1, 2 y 3, que pudo ser ocasionado por la altura del lecho que impide la evaporación de agua del mismo. Esto coincide con lo observado en la Tabla 6.5 donde al aumentar la altura del lecho disminuye el coeficiente convectivo de transferencia de masa.

En las Figuras 6.14 y 6.15 se presenta el efecto de la altura del lecho en las tasas de producción y perfiles de producción de CO<sub>2</sub> para las corridas 5 y 6.



**Figura 6.14** Tasas de producción de CO<sub>2</sub> de las corridas 5 y 6.

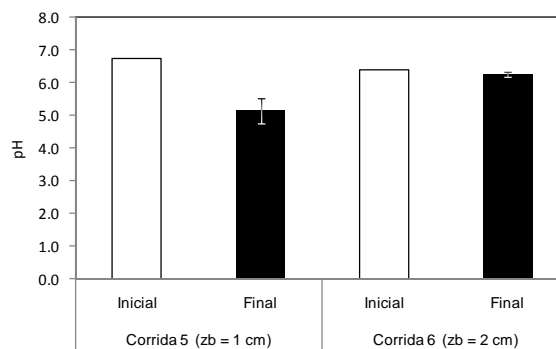
En las corridas 5 y 6 se presenta una mayor variabilidad en las tasas de producción de CO<sub>2</sub> por la circulación interna de aire provocada por los ventiladores instalados al interior del biorreactor. Se observa que al aumentar la altura del lecho de fermentación se tiene un efecto negativo en la producción de CO<sub>2</sub>, lo cual se puede apreciar mejor en la Figura 6.15.



**Figura 6.15** Perfiles de producción de CO<sub>2</sub> para las corridas 5 y 6.

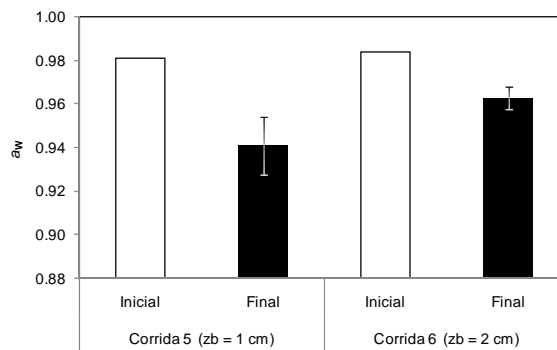
El efecto negativo en las tasas de producción y perfiles de producción de CO<sub>2</sub> puede deberse a que el aumento en la altura del lecho afecta de manera negativa la transferencia de O<sub>2</sub> del “headspace” del biorreactor al fondo del lecho de fermentación. Otra causa es el aumento de la temperatura del lecho de fermentación que afecta negativamente el metabolismo de microorganismo. Para todos los casos el modelo que mejor ajustó a los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> medidos fue el modelo de Gompertz con  $R^2 > 0.9992$ .

En la Figuras 6.16 y 6.17 se presenta el efecto de la altura del lecho de fermentación en el pH y  $a_w$  para las corridas 5 y 6.



**Figura 6.16** pH inicial y final para las corridas 5 y 6.

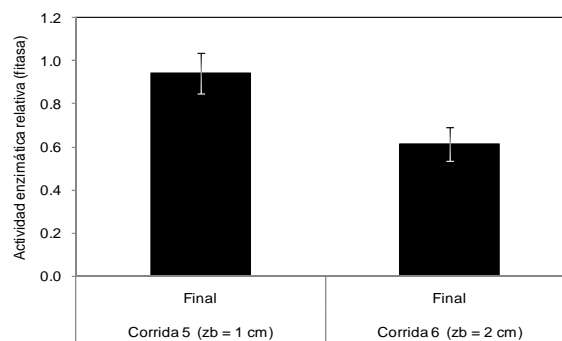
En la Figura 6.16 se puede apreciar como al aumentar la altura del lecho de fermentación se presenta un aumento en el pH final del lecho de fermentación lo cual es contrario a lo observado en las corridas 1, 2 y 3. Por otro lado se observa que en la altura del lecho de 2 cm el pH prácticamente permanece constante. Ambos fenómenos sugieren que hubo una posible disminución en la transferencia de O<sub>2</sub> del “headspace” al lecho de fermentación afectando el metabolismo microbiano.



**Figura 6.17** Actividad de agua inicial y final para las corridas 5 y 6.

Con respecto a la  $a_w$  (Figura 6.17) se observa que al aumentar la altura del lecho la  $a_w$  final aumenta ya que el metabolismo microbiano es afectado por la mayor temperatura en el lecho de fermentación.

En la Figura 6.18 se presenta el efecto de la altura del lecho sobre la actividad relativa de la fitasa.



**Figura 6.18** Actividad enzimática relativa de la fitasa para las corridas 5 y 6.

En las Figura 6.18 se observa que al aumentar la altura del lecho de fermentación se tiene un efecto negativo en la actividad enzimática relativa de la fitasa. El factor que más afecta la actividad enzimática relativa de la fitasa es la acumulación de calor ya que como puede observarse en los resultados, las mayores actividades enzimáticas relativas de la fitasa se obtuvieron en las corridas que alcanzaron menores temperaturas máximas durante la

fermentación (ver Figuras 6.5 y 6.12). También se observa que la actividad enzimática no muestra una relación con los valores de pH y  $a_w$  medidos al final de las corridas.

### 6.2.3.2 Efecto de la circulación interna de aire por convección

En esta parte se presentan los resultados del efecto de la circulación interna de aire por convección forzada. En la Tabla 6.6 se muestran tanto los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) estimados, así como, los elementos de los balances de calor y agua.

**Tabla 6.6** Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.

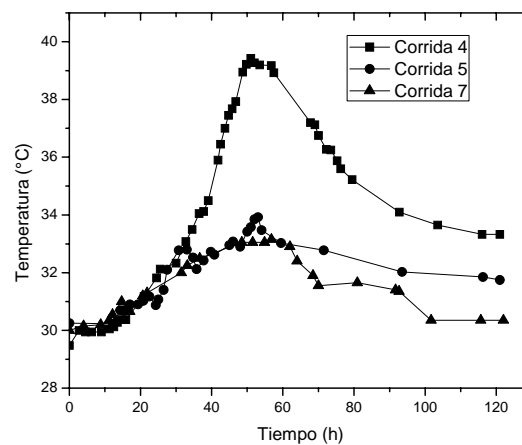
	Corrida		
	4	5	7
Altura del lecho (cm)	1.0	1.0	1.0
$N_{Re}$	1.5	4330	8631
$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.116	0.395	0.722
$U_t$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	1.146	0.746	0.326
$h_c$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	1.236	0.783	0.333
$Q_{met}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> )	3036.49	2028.10	1825.30
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-685.66	-1018.47	-1377.18
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-2342.20	-932.95	-453.14
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.284	0.420	0.568
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-0.053	0.270	0.452
$W_{met}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> )	0.104	0.070	0.062

Las corridas 4, 5 y 7 tienen la misma altura del lecho (1.0 cm). El incremento de la circulación interna del aire en el biorreactor provoca un aumento en los valores de los coeficientes de transferencia de masa ( $k_m$ ). Esto se debe a la reducción de la resistencia a la transferencia de masa desde el lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor. Por lo que el  $N_{Re}$  presenta un efecto positivo en dicho coeficiente.

Para los coeficientes de transferencia de calor ( $U_t$  y  $h_c$ ) se esperaba que estos aumentaran al aumentar el  $N_{Re}$  sin embargo esto no sucedió por lo que hay una sobre-estimación del calor sensible ( $Q_{sen}$ ) perdido por el lecho de fermentación que a su vez ocasiona una sobre-estimación de los coeficientes de transferencia de calor. Esta sobre-estimación obedece a una sub-estimación del agua evaporada del lecho ( $W_{evap}$ ) ya que el balance de masa

(agua) solo toma los valores iniciales y finales del lecho de fermentación sin considerar las variaciones de temperatura durante la FMS. La sub-estimación de  $W_{evap}$  provoca una sobre-estimación del calor sensible ( $Q_{sen}$ ) del balance de calor. Sin embargo, cabe destacar que los coeficientes convectivos de transferencia de masa y los coeficientes de transferencia de calor se encuentran en los mismos órdenes de magnitud. Además el aumento en el  $N_{Re}$  provoca un aumento en la remoción de calor por evaporación, que provoca que la remoción por pérdida de calor sensible disminuya.

En la Figura 6.19 se observa el efecto del  $N_{Re}$  sobre el perfil de temperaturas del lecho de fermentación para las corridas 4, 5 y 7.

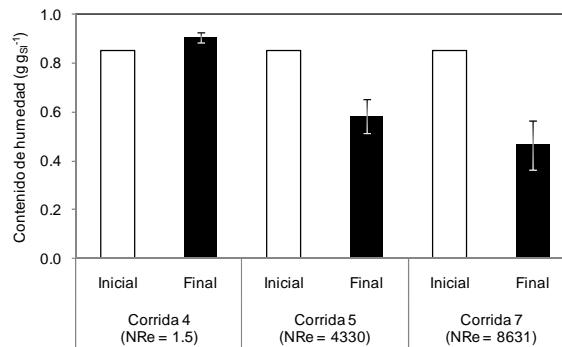


**Figura 6.19** Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas 4, 5 y 7.

En la Figura 6.19 se observa que al aumentar el  $N_{Re}$  en el “headspace” del biorreactor, disminuye la acumulación de calor en los lechos de fermentación debido a una mejora en la remoción del calor evaporativo ( $Q_{evap}$ ). Es importante remover el calor metabólico sin afectar el contenido de humedad del lecho de fermentación. Una de las formas más sencillas de remover el calor metabólico es aumentando el gasto de aire ( $G$ ) hacia el biorreactor, pero lamentablemente provoca el secado del lecho. La circulación interna de aire por convección permitió una mayor remoción de calor metabólico, impidiendo la acumulación de calor, como

lo muestran los perfiles de temperatura. La instalación de ventiladores al interior de los biorreactores de charolas para FMS, se pudieron realizar de manera sencilla sin la modificación o rediseño del biorreactor de charolas.

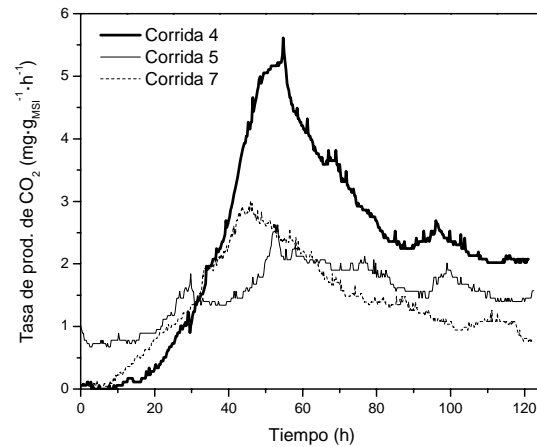
A continuación se presenta el efecto del  $N_{Re}$  sobre el contenido de humedad final en el lecho de fermentación (Figura 6.20).



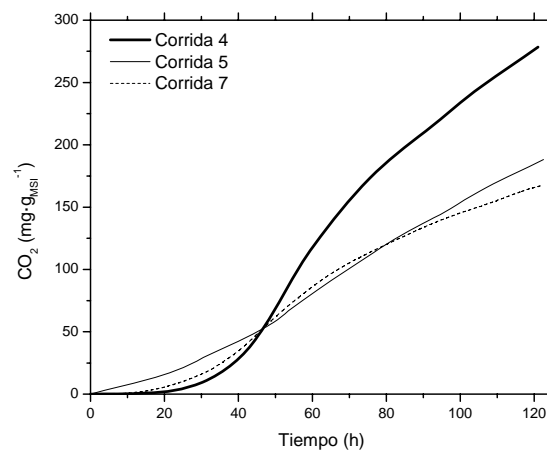
**Figura 6.20** Contenido de humedad inicial y final en el lecho de fermentación para las corridas 4, 5 y 7.

El menor contenido de humedad final observado fue para la corrida 7, que es causado por la mayor evaporación observada. Para las tres corridas la generación de agua metabólica no fue suficiente para sustituir el agua evaporada (Tabla 6.6) en contraste con los reportes previos (Mitchell y col., 2003; Smits y col., 2006). Como se observa en la Tabla 6.6 un aumento en el  $N_{Re}$  provoca un aumento en  $k_m$  lo que ocasiona un aumento en la evaporación de agua y por tanto una mayor pérdida de humedad del lecho.

En las Figuras 6.21 y 6.22 se presenta el efecto del  $N_{Re}$  en la tasa de producción y la producción de  $CO_2$ .



**Figura 6.21** Tasas de producción de CO<sub>2</sub> para las corridas 4, 5 y 7.



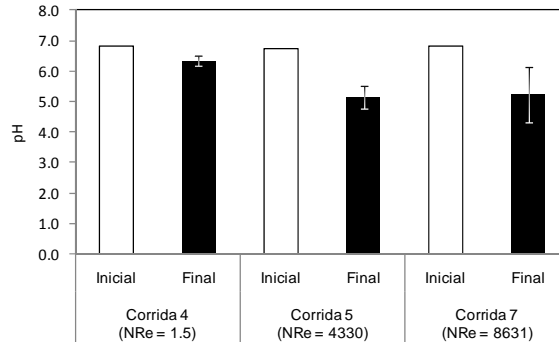
**Figura 6.22** Perfiles de CO<sub>2</sub> para las corridas 4, 5 y 7.

Como se observa en las Figuras 6.21 y 6.22 la mayor producción de CO<sub>2</sub> se tiene en la corrida 4 que es la que presenta el menor  $N_{Re}$  en el “headspace” del biorreactor lo cual no era esperado. Sin embargo, los disturbios presentes en las tasas de producción de CO<sub>2</sub> evidencian una incorrecta medición del CO<sub>2</sub> en línea durante el desarrollo de la fermentación provocando una sub-estimación de la producción de CO<sub>2</sub> que a su vez provoca una sub-estimación en el

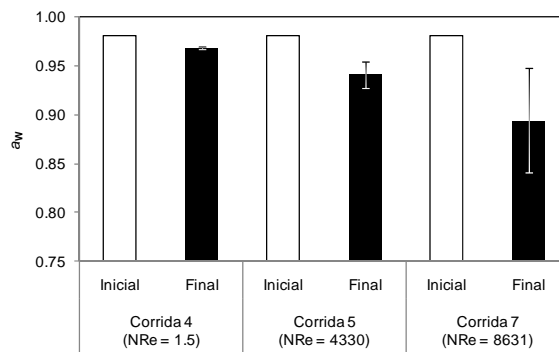


calor metabólico generado ( $Q_{\text{met}}$ ). Lo que afecta directamente en la estimación del calor sensible ( $Q_{\text{sen}}$ ). Otra razón de que se observe este comportamiento es por el secado del lecho de fermentación debido al aumento en el  $N_{\text{Re}}$  lo que afecta la conductividad del lecho al aumentar la fracción de espacios vacíos. También se observa que las corridas 5 y 7 que presentaron circulación interna de aire tienen las mayores tasas de producción de  $\text{CO}_2$  durante las primeras 30 h de fermentación. Esto puede deberse a que el uso de ventiladores para aumentar el  $N_{\text{Re}}$  en el “headspace” del biorreactor mejoró la transferencia de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  en el lecho de fermentación, lo que redujo los efectos negativos de la temperatura favoreciendo el metabolismo del microorganismo en esa etapa de la fermentación. Para todos los casos el modelo que mejor ajustó a los perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  medidos fue el modelo de Gompertz con  $R^2 > 0.9980$ .

El efecto del  $N_{\text{Re}}$  sobre el pH y  $a_w$  medido en el lecho de fermentación se puede observar en las Figuras 6.23 y 6.24.



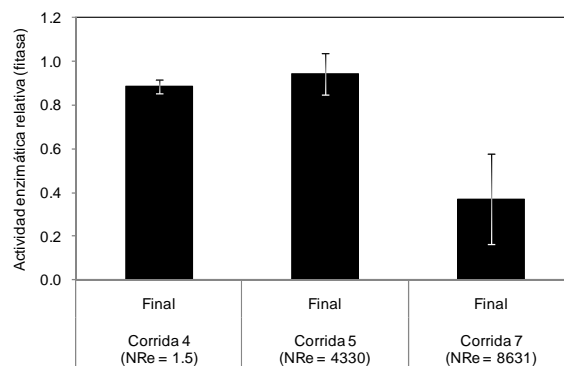
**Figura 6.23** pH inicial y final para las corridas 4, 5 y 7.



**Figura 6.24** Actividad de agua inicial y final para las corridas 4, 5 y 7.

Tanto para el pH y la  $a_w$  finales se aprecia una disminución al aumentar el  $N_{Re}$ , que pueden deberse a una mayor actividad biológica, sin embargo no existen diferencias significativas entre las corridas 5 y 7 donde se utilizó circulación interna de aire.

En la Figura 6.25 se puede apreciar el efecto del  $N_{Re}$  sobre a actividad enzimática relativa de la fitasa.



**Figura 6.25** Actividad enzimática relativa de la fitasa para las corridas 4, 5 y 7.

En la Figura 6.25 se puede observar que al aumenta el  $N_{Re}$  del “headspace” del biorreactor de 1.5 a 4330 se tiene un efecto positivo en la actividad enzimática relativa (fitasa), debido a la disminución en la acumulación de calor, aunque dicho efecto no es significativo estadísticamente. Sin embargo, el incremento del  $N_{Re}$  de 4330 a 8631 tiene un efecto negativo

sobre la actividad enzimática relativa de la fitasa. Esto se debe a la disminución en el contenido de humedad del lecho de fermentación. Como se mencionó en la sección anterior no se observó ninguna relación entre la actividad enzimática relativa y los valores de pH y actividad de agua ( $a_w$ ) obtenidos al final de cada fermentación.

### 6.2.4 Validación de modelo

Los coeficientes de transferencia de masa (agua) y calor estimados experimentalmente fueron usados en el modelo matemático propuesto en este trabajo. La comparación de los valores experimentales de temperatura ( $T_b$ ) y contenido de agua del lecho de fermentación ( $W_b$ ) con los valores predichos por las Ecs. (8) y (15) validaron el modelo desarrollado. Datos experimentales y predichos para los balances de calor y de masa (agua) son mostrados en las Tablas 6.7 a 6.10.

**Tabla 6.7** Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.

	Corrida		
	1	2	3
<b>Altura del lecho (cm)</b>	<b>0.2</b>	<b>0.67</b>	<b>0.91</b>
$N_{Re}$	<b>0.54</b>	<b>1.76</b>	<b>2.31</b>
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-1036.85	-896.97	-806.28
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-731.53	-847.52	-789.01
Error en predicción de $Q_{evap}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-29.45	-5.51	-2.14
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-2493.23	-1955.83	-1784.83
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-2638.85	-1801.13	-1594.44
Error en predicción de $Q_{sen}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	5.84	-7.91	-10.67
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.428	0.371	0.334
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicho por el modelo	0.302	0.351	0.327
Error en predicción de $W_{evap}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-29.46	-5.55	-2.09
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-0.117	0.066	0.090
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-0.086	0.074	0.088
Error en predicción de pérdida de agua desde lecho (%)	-26.39	11.72	-1.92

<sup>a</sup>Error =  $100 \times (\text{predicho} - \text{medido}) / \text{medido}$

**Tabla 6.8** Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.

	Corrida	
	5	6
<b>Altura del lecho (cm)</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>
$N_{Re}$	<b>4330</b>	<b>4330</b>
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-1018.47	-751.00
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-1116.79	-739.14
Error en predicción de $Q_{evap}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	9.65	-1.58
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-932.95	-997.36
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-746.74	-866.80
Error en predicción de $Q_{sen}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-19.96	-13.09
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.420	0.310
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicho por el modelo	0.461	0.306
Error en predicción de $W_{evap}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	9.66	-1.55
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	0.270	0.154
Perdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	0.307	0.147
Error en predicción de pérdida de agua desde lecho (%)	13.66	-4.38

<sup>a</sup>Error = 100 × (predicho – medido) / medido

**Tabla 6.9** Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.

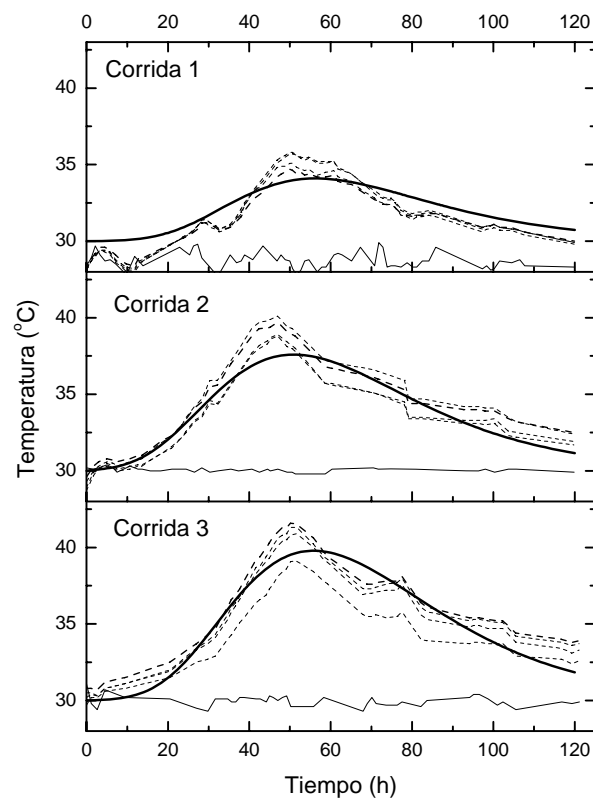
	Corrida		
	4	5	7
<b>Altura del lecho (cm)</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>
$N_{Re}$	<b>1.5</b>	<b>4330</b>	<b>8631</b>
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-685.66	-1018.47	-1377.18
$Q_{evap}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-671.63	-1116.79	-1436.91
Error en predicción de $Q_{evap}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-2.05	9.65	4.34
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-2342.20	-932.95	-453.14
$Q_{sen}$ (J g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-2104.27	-746.74	-232.31
Error en predicción de $Q_{sen}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-10.16	-19.96	-48.73
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.284	0.420	0.568
$W_{evap}$ (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicho por el modelo	0.278	0.461	0.592
Error en predicción de $W_{evap}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-2.11	9.66	4.33
Pérdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-0.053	0.270	0.452
Perdida de agua (g g <sub>MSI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-0.038	0.307	0.479
Error en predicción de pérdida de agua desde lecho (%)	-28.30	13.66	6.07

<sup>a</sup>Error = 100 × (predicho – medido) / medido

Las Tablas mencionadas anteriormente muestran pequeños errores de predicción para los valores totales de  $Q_{evap}$ ,  $Q_{sen}$ ,  $W_{evap}$  y pérdida de agua. Los errores obtenidos en las estimaciones se encuentran en el orden de magnitud de trabajos previos (Weber y col., 2002;

Khanahmadi y col., 2006). Estas variaciones se presentan por la sobre-estimación o sub-estimación de la cantidad de agua evaporada estimada por el balance de agua (Ec. 5) ya que solo se emplean los valores iniciales y finales del contenido de agua en el lecho de fermentación ( $W_b$ ) en el balance mencionado.

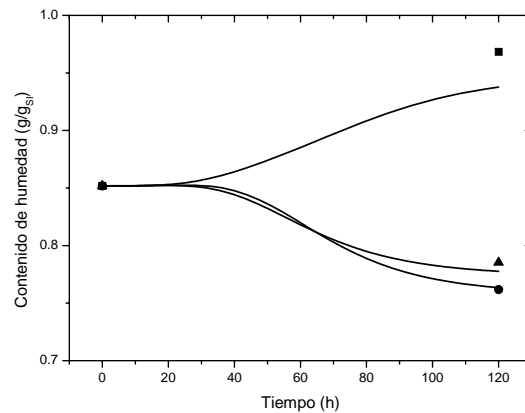
En las Figuras 6.26 a 6.31 se muestran los datos experimentales y predichos de temperatura y contenido de agua del lecho de fermentación.



**Figura 6.26** Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos de temperatura (línea continua gruesa). Para las corridas 1, 2 y 3.

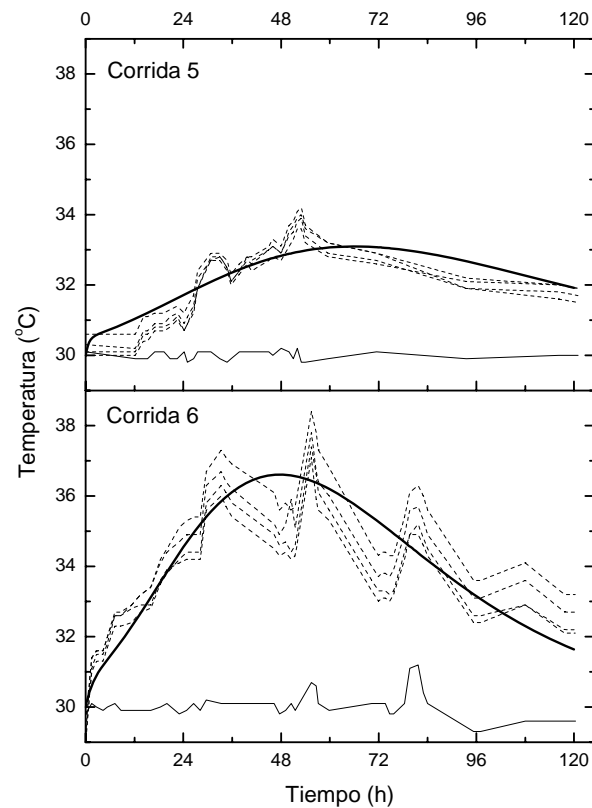
Para las corridas 1, 2 y 3 donde se estudió el efecto de la altura del lecho se tiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.954, 0.960 y 0.926 respectivamente. Esto nos indica

que hay un buen ajuste entre los valores experimentales y predichos por el modelo para la temperatura del lecho de fermentación.



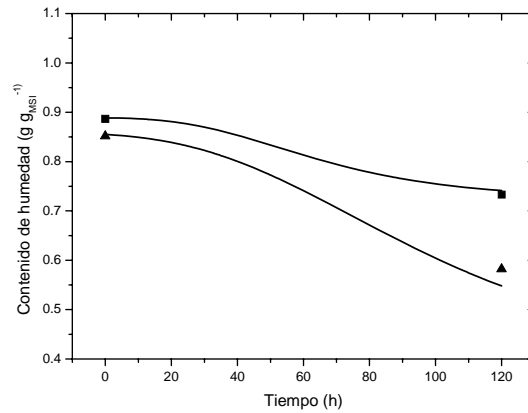
**Figura 6.27** Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas). ■: Corrida 1, ▲: Corrida 2, ●: Corrida 3.

En la Figura 6.27 se presenta el contenido de humedad del lecho de fermentación para las corridas 1, 2 y 3. Los errores observados entre los valores experimentales y predichos fueron -3.18, .0.98 y 0.72 respectivamente, lo que demuestra un buen ajuste entre los valores predichos por el modelo y los experimentales.



**Figura 6.28** Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos de temperatura (línea continua gruesa). Para las corridas 5 y 6.

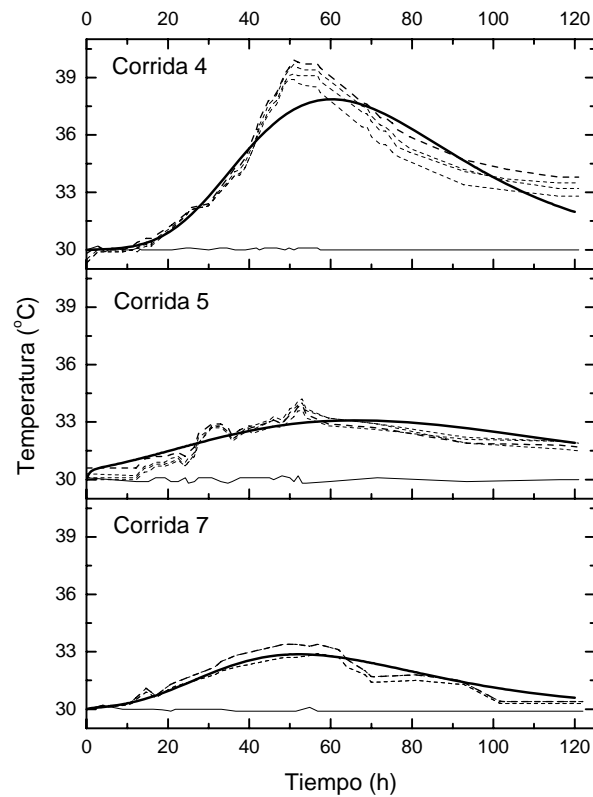
En la Figura 6.28 para las corridas 5 y 6, donde hubo circulación interna de aire y se varió la altura del lecho, se tiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.915 y 0.841 respectivamente, lo que indica que hay un buen ajuste entre los valores experimentales y los predichos por el modelo para la temperatura del lecho de fermentación.



**Figura 6.29** Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas). ▲: Corrida 5 y ■: Corrida 6.

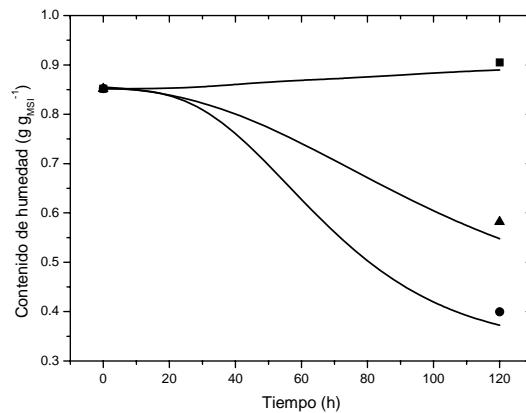
Con respecto al contenido de humedad (Figura 6.29) de las corridas 5 y 6 se presentó un error de -5.88 y 1.11 respectivamente, por lo que puede decirse que existe un buen ajuste entre los valores predichos por el modelo y los valores experimentales.





**Figura 6.30** Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos (línea continua gruesa). Para las corridas 4, 5 y 7.

En las corridas 4, 5 y 7 donde se evaluó el efecto del  $N_{Re}$  manteniendo la misma altura del lecho de fermentación se tuvieron coeficientes de correlación de Pearson 0.958, 0.915 y 0.941 respectivamente. Estos nos indica que hubo un buen ajuste entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo para la temperatura del lecho de fermentación.



**Figura 6.31** Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas). ■: Corrida 4, ▲: Corrida 5, ●: Corrida 7.

Por último en la Figura 6.31 se presenta el contenido de humedad del lecho de fermentación para las corridas 4, 5 y 7, donde se presentó un error de -1.69, -5.88 y -3.20 %, por lo que puede decirse que existe un buen ajuste entre los valores predichos por el modelo y los valores experimentales.

En las Figuras mencionadas anteriormente se puede observar un buen ajuste entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo de temperatura para todas las corridas realizadas en este trabajo. También se observa un buen ajuste para la predicción de los valores de contenido de humedad final del lecho fermentación.

En todas las corridas se observa que existe un ligero desfase en los valores máximos de temperatura experimentales y los valores predichos del modelo. Esta desviación puede deberse a la cinética de producción de  $\text{CO}_2$  obtenida a partir del modelo de Gompertz usado en el modelo matemático desarrollado. Para el caso de las estimaciones del contenido de humedad final en el lecho de fermentación, además de ser afectados por lo mencionado anteriormente, los errores presentes tienen su origen en la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) usados en el modelo matemático desarrollado.

### 6.2.5 Conclusiones parciales del estudio en soporte-sustrato

En la FMS con soporte-sustrato, no se observó un efecto claro de las variables de operación estudiadas (altura del lecho de fermentación y  $N_{Re}$ ) sobre los coeficientes de transferencia de calor y mas (agua), ya que el modelo propuesto solo consideró la pérdida de materia seca del lecho de fermentación pero no los cambios en su composición como ocurre en soporte-sustrato durante el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, los valores estimados se encontraron en el mismo orden de magnitud. Se observó que llevar a cabo el muestreo solo al inicio y al final de la fermentación no permitió conocer como se llevan a cabo los mecanismos de transferencia de calor y masa (agua) durante la FMS provocando, ya sea, la sub o sobre-estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua), siendo necesario realizar muestreos periódicos durante la fermentación.

Los periodos largos de FMS en biorreactor de charolas como los observados en el presente estudio con soporte-sustrato (120 h) son mas susceptibles a contaminarse por lo que no pueden realizarse muestreos periódicos durante la fermentación, además que provocan una acumulación lenta de calor en el lecho de fermentación lo que ocasiona tener coeficientes de transferencia de calor que por su orden de magnitud no permiten ver claramente el efecto de las variables de operación.

El aumento en la altura del lecho ocasiona un aumento en la acumulación de calor que provoca un efecto negativo en la producción de  $CO_2$  y una disminución en la actividad enzimática relativa de la fitasa. El efecto de la altura del lecho es claro cuando las condiciones de circulación en el “headspace” del biorreactor son homogéneas, lo cual se consiguió con el sistema de ventilación.

El aumento en el  $N_{Re}$  provocó un aumento en la actividad enzimática relativa de la fitasa, sin embargo manejar  $N_{Re}$  muy altos provoca una disminución en la actividad enzimática relativa. Además el aumento en el  $N_{Re}$  afecta negativamente la producción de  $CO_2$  debido al secado del lecho de fermentación. Siendo necesario encontrar un valor de  $N_{Re}$  óptimo.

El modelo matemático propuesto usando los coeficientes de transferencia obtenidos por los balances integrales de calor y agua predijeron adecuadamente los perfiles de temperatura y el contenido de humedad final del lecho de fermentación.

El uso de un soporte inerte impregnado con un medio de cultivo definido nos permite diseñar un sistema modelo con menores variaciones en sus propiedades termodinámicas, un crecimiento más rápido del microorganismo y por tanto menos susceptible a contaminaciones, un mejor muestro y medición de variables (consumo de sustrato, producción de biomasa, etc.) durante la FMS.

En la siguiente sub-sección se presentan los estudios realizados sobre soporte inerte, así como la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) y la validación del modelo matemático propuesto.

### 6.3 Estudios en soporte inerte.

Las condiciones de operación de los diferentes experimentos de FMS en soporte inerte están descritas en la Tabla 6.10.

**Tabla 6.10** Condiciones de operación de FMS con soporte inerte.

Condición experimental	A	B	C
Ventiladores	No	No	Si
$G$ (cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	1000	1900	1900
$N_{Re}^a$	1.33	2.53	2839
$z_b$ (cm)	1.5	2.5	2.5
$v$ (cm s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	-	-	50
VKgM	1.41	1.61	1.61
$W_b$ (g·g <sub>IS</sub> <sup>-1</sup> )	1.24	1.24	1.22
pH	5.96	5.57	5.80
$a_w$	0.976	0.977	0.977

<sup>a</sup>En las corridas 1 y 2,  $N_{Re} = L \cdot G \cdot \rho_{air} \cdot (A_T \cdot \mu_{air})^{-1}$ , en la corrida 3,  $N_{Re} = L \cdot v \cdot \rho_{air} \cdot \mu_{air}^{-1}$ .

<sup>b</sup>En las corridas 1 and 2  $v$  es demasiado bajo para ser medido.

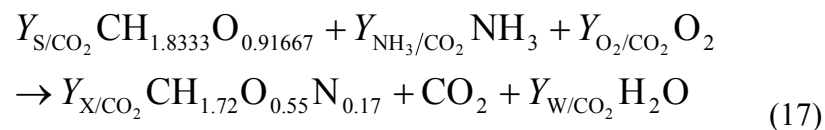
En las corridas A y B la altura del lecho de fermentación aumentó de 1.5 a 2.5 cm y el gasto de aire se aumentó consecuentemente a fin de mantener los mismos VKgM. En las

corridas 2 a 3, se mantuvo constante la altura del lecho en 2.5 cm mientras que en la corrida C la circulación interna forzada de aire fue lograda por un sistema de ventiladores.

Los coeficientes de rendimiento y los coeficientes de transferencia de calor y agua fueron obtenidos experimentalmente. Se evaluó el efecto de las variables de operación tales como la altura del lecho de fermentación y la circulación interna forzada de aire, sobre la transferencia de calor del lecho de fermentación al aire en el “headspace” del biorreactor de charolas. Finalmente, el modelo desarrollado fue validado mediante la comparación de los valores predichos del modelo y los valores experimentales.

### 6.3.1 Balance estequiométrico

Se propuso la siguiente biorreacción para el crecimiento de *Aspergillus niger* C28B25, asumiendo crecimiento aerobio sin formación de producto.



La composición elemental promedio de la biomasa de *A. niger* fue asumida como  $CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$  (Nielsen y col., 2003). Al aplicar balances elementales se obtiene un sistema algebraico sub-estimado, ya que hay cinco rendimientos desconocidos, pero solo pueden realizarse cuatro balances. A fin de tener un sistema algebraico bien definido uno de los coeficientes de rendimiento debe ser medido independientemente. El uso de un soporte inerte como la agrolita y un medio de cultivo definido permitieron la estimación precisa del rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{X/S}$ ).

### 6.3.2 Estimación de los coeficientes de rendimiento

Los datos cinéticos de producción de biomasa y consumo de sustrato para cada corrida (Tabla 6.11) fueron usados para obtener  $Y_{X/S}$ . Este valor y la ecuación de biorreacción (Ec. 1) permitieron la estimación de los siguientes coeficientes de rendimientos:  $Y_{S/CO_2}$ ,  $Y_{NH_3/CO_2}$ ,

$Y_{O_2/CO_2}$ ,  $Y_{X/CO_2}$  y  $Y_{W/CO_2}$  (Tabla 6.11). Los coeficientes de rendimiento  $Y_{S/CO_2}$  y  $Y_{X/CO_2}$  fueron también obtenidos experimentalmente.

**Tabla 6.11** Coeficientes de rendimiento estimados obtenidos a partir de los balances estequiométricos (Ec. 2).

	Corrida		
	A	B	C
$Y_{X/S}$ (CmolX·cmolS <sup>-1</sup> )	0.40	0.34	0.46
$Y_{S/CO_2}$ (CmolS·molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	1.67	1.52	1.83
$Y_{O_2/CO_2}$ (molO <sub>2</sub> ·molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	0.98	0.99	0.98
$Y_{X/CO_2}$ (CmolX·molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	0.67	0.52	0.83
$Y_{W/CO_2}$ (molW·molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	1.13	1.08	1.18
$Y_{NH_3/CO_2}$ (molNH <sub>3</sub> ·molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	0.11	0.09	0.14
RC (molCO <sub>2</sub> ·molO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	1.02	1.01	1.02

En las corridas A, B y C los valores de  $Y_{S/CO_2}$  obtenidos experimentalmente fueron 1.5, 1.72 y 1.84 CmolS·molCO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, respectivamente y los de  $Y_{X/CO_2}$  fueron 0.75, 0.54 y 0.76 CmolX·molCO<sub>2</sub><sup>-1</sup>, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los valores de los rendimientos experimentales y los estimados. Este hecho refleja que los balances estequiométricos propuestos para el modelo son adecuados.

Una vez que se conocen todos los coeficientes de rendimiento de la biorreacción se pueden estimar los componentes de la misma con solo conocer el valor de uno de ellos. Una de las variables que más fácilmente puede ser medida en línea es la producción de CO<sub>2</sub>. La tasa de producción de CO<sub>2</sub>, para los experimentos con soporte inerte (agrolita) fue modelada usando la ecuación logística (Ec. 5) ya que permitió obtener los mejores ajustes.

### 6.3.3 Estimación de los coeficientes de transferencia de masa

Las mediciones del contenido de agua ( $W_{b,i}$ ,  $W_{b,j}$ ) y la producción de agua metabólica ( $W_{met,i,j}$ ) fueron usadas para calcular el agua evaporada en cada intervalo de tiempo definido por el muestreo realizado al lecho de fermentación. Como se señala en la Ec. (6),  $Y_{W/CO_2}$  fue usado para determinar la producción de agua metabólica como una función de la producción de CO<sub>2</sub>. El contenido de humedad del aire promedio ( $H_s$ ,  $H_a$ ), estimado para la superficie del

lecho de fermentación y para el aire en el “headspace” del biorreactor; así como el valor de la masa de agua evaporada (Ecs. 4 y 7) fueron usados para estimar el coeficiente de transferencia de masa (agua) ( $k_m$ ). En otras palabras el balance de agua y las temperaturas medidas en el lecho de fermentación en las cuatro charolas fueron usados para estimar  $k_m$ . Empleando las Ecs. (5) y (7), la subrutina “Solver” de Excel® nos permite estimar el valor del coeficiente de transferencia de masa (Figura 6.4).

La Tabla 6.12 muestra los valores de los balances de agua y de los coeficientes de transferencia de masa ( $k_m$ ) estimados para las condiciones experimentales estudiadas para cada intervalo de tiempo. En los intervalos de tiempo (iniciales) donde la temperatura del lecho de fermentación es menor que la temperatura del aire ( $T_a$ ), no fue estimado  $k_m$  (Figura 6.4).

**Tabla 6.12** Balance de agua y coeficientes de transferencia de masa estimados.

Intervalo de tiempo (h)	$W_{\text{met},i,j}$	<i>Pérdida de agua</i> (J g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$W_{\text{evap},i,j}$	$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Corrida A</b>				
0.0 – 8.67	0.001	0.099	0.100	na
8.67 – 15.08	0.004	0.052	0.056	2.44
15.08 – 19.58	0.013	0.011	0.024	0.18
19.58 – 25.67	0.044	0.064	0.108	0.84
25.67 – 31.83	0.035	0.082	0.117	1.40
<b>Corrida B</b>				
0.0 – 5.0	0.000	0.045	0.045	na
5.0 – 10.17	0.001	0.02	0.021	na
10.17 – 13.08	0.002	0.006	0.008	0.66
13.08 – 18.67	0.014	0.034	0.048	0.81
18.67 – 22.75	0.026	0.065	0.091	0.85
22.75 – 25.75	0.019	0.063	0.082	1.25
25.75 – 30.0	0.016	0.07	0.086	1.62
<b>Corrida C</b>				
0.0 – 7.08	0.001	0.057	0.058	na
7.08 – 11.25	0.002	0.025	0.027	na
11.25 – 15.50	0.009	0.02	0.029	1.15
15.50 – 19.58	0.024	0.054	0.078	1.51
19.58 – 23.00	0.026	0.063	0.089	1.88
23.00 – 26.50	0.017	0.054	0.071	2.58
26.50 – 30.08	0.013	0.059	0.072	3.62

na::  $T_a > T_b$ , por lo tanto el modelo no puede aplicarse

### 6.3.4 Estimación de los coeficientes de transferencia de calor

Con el valor de la masa de agua evaporada  $W_{\text{evap}}$  y el calor latente de vaporización, el calor utilizado para la evaporación de agua ( $Q_{\text{evap}}$ ) fue calculado. También a partir del  $\text{CO}_2$  producido se puede calcular la generación de calor metabólico ( $Q_{\text{met}}$ ) y a partir de los perfiles de temperatura y la capacidad calorífica ( $C_{p_b}$ ) del lecho de fermentación puede calcularse la acumulación de calor ( $Q_{\text{acum}}$ ). Usando los mecanismos de transferencia de calor (Ec. 11) es posible calcular el calor sensible ( $Q_{\text{sen}}$ ) removido del lecho de fermentación.  $Q_{\text{met}}$  y las diferencias de temperatura del lecho de fermentación y el “headspace” dentro del reactor, junto con el balance de energía (Ecs. 10-15), fueron usados para estimar numéricamente el coeficiente global ( $U_t$ ) y el convectivo ( $h_c$ ) de transferencia de calor (Tabla 6.13).

**Tabla 6.13** Balances de energía y coeficientes de transferencia de calor estimados.

Intervalo de tiempo (h)	$Q_{\text{acum}}$	$Q_{\text{met}}$	$Q_{\text{evap}}$	$Q_{\text{sen}}$	$U_t$	$h_c$
		( $\text{J g}_{\text{SI}}^{-1}$ )			( $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$ )	
<b>Corrida A</b>						
0.0 – 8.67	38.36	17.53	-244.06	264.88	na	na
8.67 – 15.08	15.15	150.42	-134.68	-0.58	0.005	0.005
15.08 – 19.58	12.30	370.25	-57.42	-303.53	7.55	9.81
19.58 – 25.67	1.42	1030.3	-261.54	-767.34	7.05	8.98
25.67 – 31.83	-8.84	585.83	-282.41	-312.27	3.82	4.42
<b>Corrida B</b>						
0.0 – 5.0	36.05	0.03	-108.36	144.38	na	na
5.0 – 10.17	2.63	19.88	-52.23	34.98	na	na
10.17 – 13.08	13.34	44.61	-18.24	-13.03	1.40	1.51
13.08 – 18.67	37.61	325.96	-116.78	-171.57	3.88	4.84
18.67 – 22.75	20.52	595.24	-217.16	-357.56	5.24	7.14
22.75 – 25.75	-25.37	445.30	-197.24	-273.42	6.00	8.63
25.75 – 30.0	-25.60	382.53	-209.66	-198.47	4.55	5.92
<b>Corrida C</b>						
0.0 – 7.08	52.48	11.01	-141.85	183.34	na	na
7.08 – 11.25	5.26	42.28	-64.47	27.45	na	na
11.25 – 15.50	15.78	185.14	-68.72	-100.63	5.87	8.37
15.50 – 19.58	16.22	515.53	-189.98	-309.34	7.47	12.02
19.58 – 23.00	-16.05	559.81	-215.78	-360.07	9.84	19.66
23.00 – 26.50	1.46	349.73	-169.85	-178.42	6.15	8.93
26.50 – 30.08	-12.75	266.14	-175.43	-103.46	4.44	7.52

na.:  $T_a > T_b$ , por lo tanto el modelo no puede aplicarse



La Tabla 6.13 muestra los valores de los balances de calor para las condiciones experimentales estudiadas en este trabajo y los coeficientes de transferencia de calor estimados ( $U_t$  y  $h_c$ ) para cada intervalo de tiempo. Como se mencionó previamente, hubo intervalos donde la temperatura del lecho de fermentación ( $T_b$ ) fue menor que la temperatura de la corriente de aire ( $T_a$ ), en tales intervalos,  $U_t$  y  $h_c$  no fueron estimados.

### **6.3.5 Efecto de las variables de operación.**

En los experimentos realizados en biorreactor de charolas para FMS usando un soporte inerte (agrolita) se estudió el efecto de dos de las principales variables que tienen un efecto importante en el desempeño de este tipo de biorreactor: i) altura del lecho y ii) circulación interna forzada de aire.

#### **6.3.5.1 Efecto de la altura del lecho de fermentación**

La altura del lecho de fermentación y el número de charolas son las únicas dos formas para llevar razonablemente el escalamiento de procesos de FMS en biorreactores de charola. El efecto de la altura del lecho de fermentación puede observarse cuando se comparan los resultados de las corridas A y B (Tabla 6.14). En la corrida A fue usada una altura de lecho de 1.5 cm mientras que en la corrida 2 la altura del lecho fue de 2.5 cm. Con el fin de suministrar una cantidad similar del aire saturado con agua por Kg de soporte inerte, se aumentó el flujo de aire de alimentación desde 1000 a 1900  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$  para un lecho de 1.5 a 2.5 cm, respectivamente como se mostró en la Tabla 6.10.

La Tabla 6.14 muestra el efecto de la altura del lecho al comparar los coeficientes de transferencia de masa promedio obtenidos a partir de los balances parciales de agua presentados en la Tabla 6.12. También se muestra los promedios de los coeficientes de transferencia de calor obtenidos a partir de los balances de energía para cada corrida mostrados en la Tabla 6.13.

**Tabla 6.14** Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.

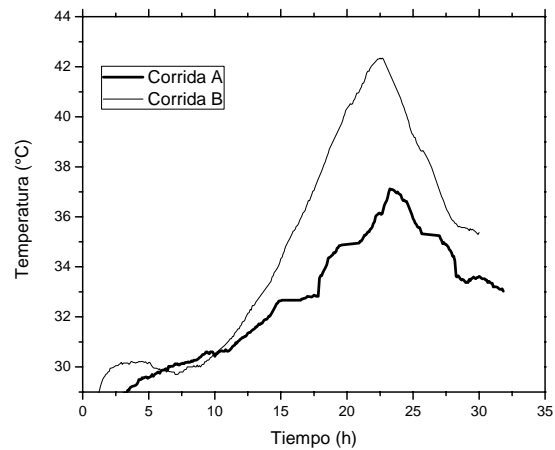
	Corridas	
	A	B
$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	1.22 ± 0.96 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.39 <sup>a</sup>
$U_t$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	4.61 ± 3.49 <sup>b</sup>	4.22 ± 1.76 <sup>b</sup>
$h_c$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	5.78 ± 4.54 <sup>c</sup>	5.61 ± 2.69 <sup>c</sup>
$Q_{met}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> )	2154.33	1813.55
$Q_{evap}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-980.11	-919.67
$Q_{sen}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-1118.84	-834.69
$W_{evap}$ (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.405	0.381
Pérdida de agua (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	0.308	0.238
$W_{met}$ (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> )	0.097	0.078

<sup>a,b,c</sup> Misma letra indica que no hay diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

El incremento en la altura del lecho causa una reducción (8.5%) del coeficiente global de transferencia de calor ( $U_t$ ); sin embargo el análisis estadístico de los coeficientes muestra que no hay diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) debido al incremento del valor de la altura del lecho,  $z_b$ . Aunque el suministro de aire fue casi duplicado, el promedio de los coeficientes convectivos de transferencia de calor ( $h_c$ ) permanecen prácticamente constante debido a que el número de Reynolds ( $N_{Re}$ ) solo incrementa de 1.33 a 2.53, permaneciendo en condiciones de flujo laminar, prácticamente bajo condiciones estáticas.

Los coeficientes de transferencia de calor estimados por el balance de energía en este trabajo son similares a los predichos anteriormente para biorreactores de charolas para FMS (Mitchell y col., 2006).

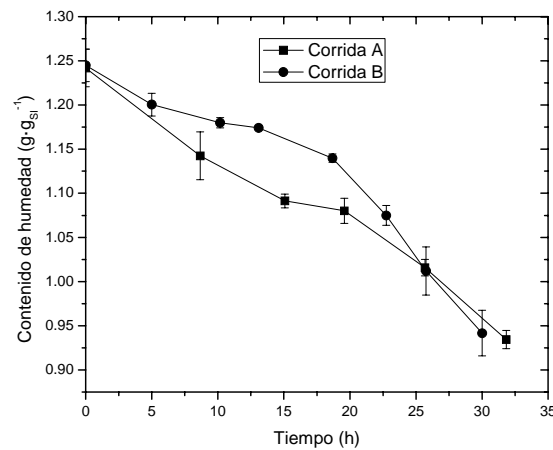
En la Figura 6.32 se muestran los perfiles de temperaturas para los lechos de fermentación de las corridas A y B.



**Figura 6.32** Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas A y B.

El incremento en la altura del lecho provoca una reducción en  $U_t$  resultando en una mayor acumulación de calor. Como se aprecia en la Figura 6.32 la temperatura máxima para los lechos de fermentación de 1.5 y 2.5 cm fueron 37 y 42° C respectivamente. Para todos los casos el modelo que mejor ajustó a los perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  fue el modelo Logístico con  $R^2 > 0.9992$ .

En la Figura 6.33 se muestran los valores de contenido de humedad promedio del lecho de fermentación para las corridas A y B.



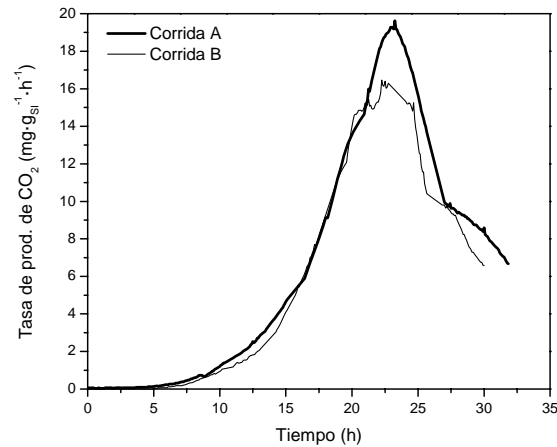
**Figura 6.33** Contenido de humedad promedio del lecho de fermentación para las corridas A y B.

En la Figura 6.33 se observa que para la corrida A hay una mayor tasa de evaporación en la primera etapa de la fermentación que después es contrarrestada por la generación de agua metabólica entre las 15 y 20 h de fermentación. En la corrida B se observa que la tasa de evaporación fue menor que en la corrida A debido al efecto del espesor del lecho de fermentación que ocasiona una disminución en el coeficiente de transferencia de masa (ver Tabla 6.14).

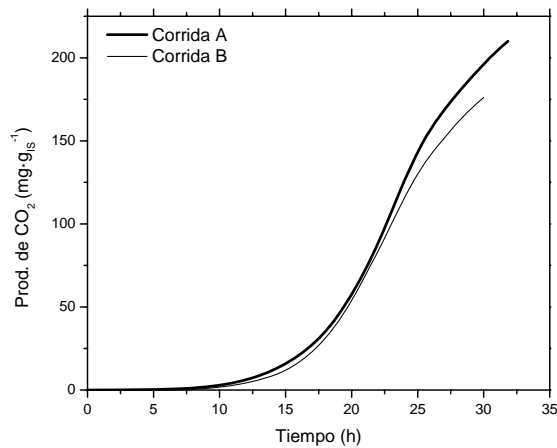
No hay un efecto significativo sobre el contenido de agua final de los lechos de fermentación con diferentes alturas. Sin embargo nuestros resultados muestran que se presenta evaporación y que ésta contribuye a la remoción de calor.

Aunque el aire que rodea al lecho de fermentación fue suministrado con un alto contenido de humedad (saturado al 100%) la generación de agua metabólica no es suficiente para reemplazar el agua perdida por evaporación. Esto contrasta con el modelo de Smits y col. (1999) y confirmado en posteriores revisiones (Mitchell y col., 2003; Mitchell y col., 2006).

En las Figuras 6.34 y 6.35 se presenta el efecto de la altura del lecho sobre la tasa de producción y los perfiles de producción de CO<sub>2</sub>.



**Figura 6.34** Tasas de producción de CO<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.

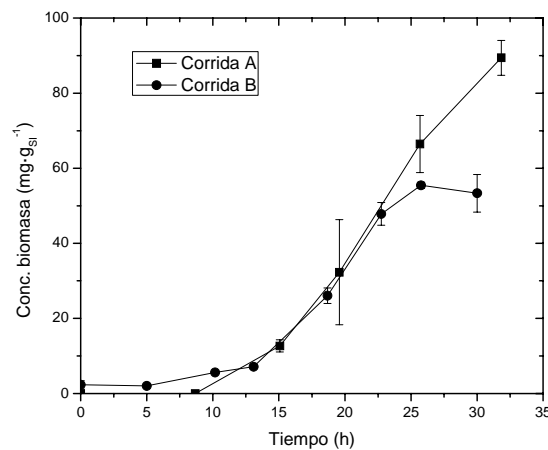


**Figura 6.35** Producción de CO<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación para las corridas A y B.

La cinética de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en las corridas A y B fueron similares durante las primeras 21 h de cultivo; a partir de ese momento el incremento de la temperatura en el lecho de FMS de 2.5 cm de altura (corrida B) tuvo un efecto negativo en la producción de CO<sub>2</sub>. La mayor producción de CO<sub>2</sub> se observó en la corrida A. La producción total de CO<sub>2</sub>

en la corrida B fue menor (16%) comparada a la obtenida en la corrida A con una altura del lecho de 1.5 cm. Una menor altura de lecho favorece la transferencia de  $O_2$  y  $CO_2$  en el lecho de fermentación. Al aumentar la altura del lecho dicha transferencia se ve afectada negativamente ya que en las partes inferiores del lecho de fermentación no se alcanzan buenas concentraciones de  $O_2$ , necesarias para el metabolismo del microorganismo. Además de que el aumento de temperatura en el lecho de fermentación afecta el metabolismo del microorganismo.

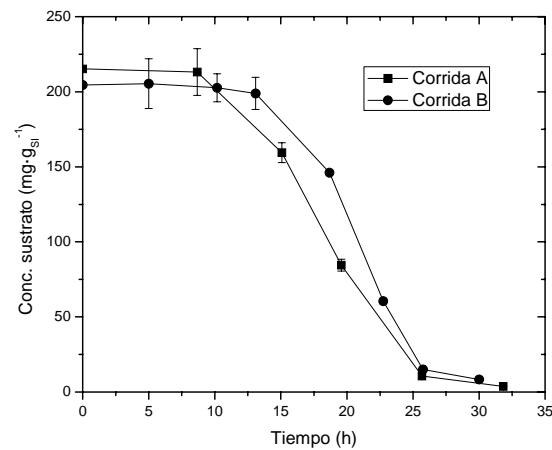
En la Figura 6.36 se presenta la concentración de biomasa en el lecho de fermentación para las corridas A y B.



**Figura 6.36** Producción de biomasa bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.

En la Figura 6.36 se observa que igual que en la producción de  $CO_2$ , la producción de biomasa de las corridas A y B tiene un comportamiento similar en las primeras 21 h de fermentación. A partir de las cuales el aumento en la temperatura del lecho de fermentación de la corrida B tiene un efecto negativo en la producción de biomasa.

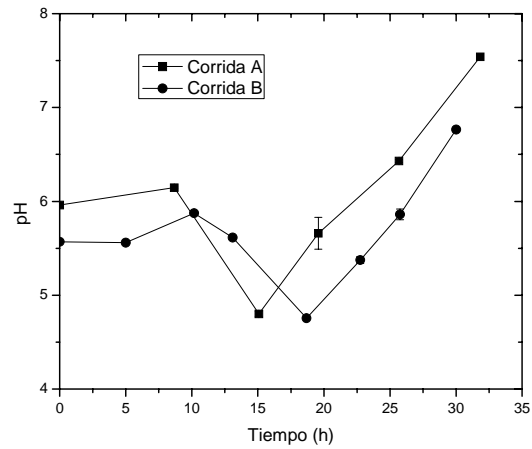
El consumo de sustrato durante la fermentación se muestra en la Figura 6.37.



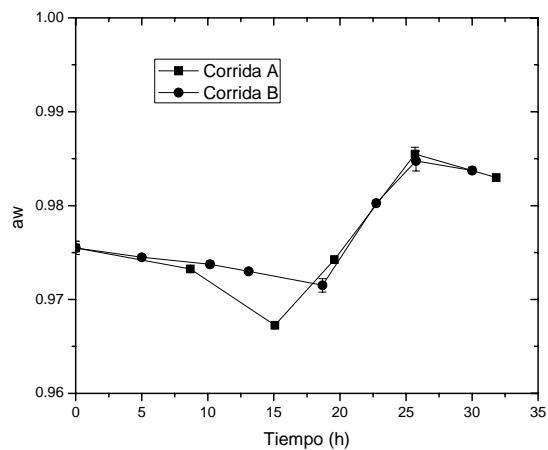
**Figura 6.37** Consumo de sustrato bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.

En el consumo de sustrato se observa que para la corrida A, el sustrato comienza a agotarse más rápido que en la corrida B. Esto puede deberse a la menor disponibilidad de  $O_2$  al aumentar la altura del lecho de fermentación. Así como también los efectos negativos del aumento de la temperatura en el lecho sobre el metabolismo del microorganismo.

En las Figuras 6.38 y 6.39 se presentan los perfiles de pH y  $a_w$  en el lecho de fermentación.



**Figura 6.38** Perfiles de pH bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.



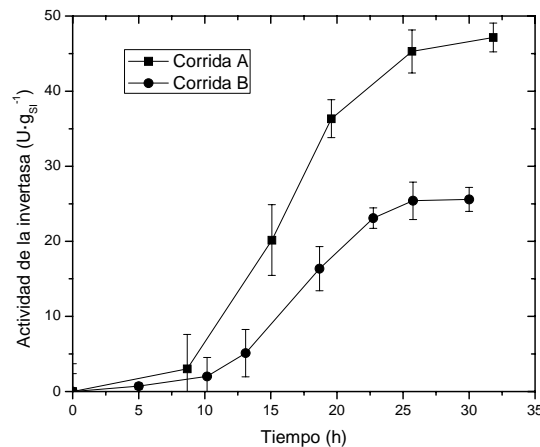
**Figura 6.39** Perfiles de  $a_w$  bajo diferentes condiciones de operación de las corridas A y B.

En los perfiles de pH y  $a_w$  se observan comportamientos similares, sin embargo en la corrida B se observa un retraso en la aparición de los valores mínimos tanto de pH como de  $a_w$  del lecho de fermentación, de aproximadamente 3.5 h. Esto puede deberse a la disminución de los coeficientes de transferencia de masa, como se ve para el agua en las Tablas 6.12 y 6.14, al interior del lecho de fermentación que podría limitar la disponibilidad de  $O_2$ , para el



microorganismo. La disminución del pH y  $a_w$  puede deberse a la generación de ácidos orgánicos y/o producción de metabolitos intermedios que influyen sobre estas variables.

El efecto de la altura del lecho sobre la actividad enzimática invertasa se presenta en la Figura 6.40.



**Figura 6.40** Actividad enzimática de la invertasa para las corridas A y B.

En la Figura 6.40 se observa que el aumento en la altura de lecho tiene un efecto negativo en la actividad enzimática, al disminuir prácticamente un 50%. Esto es debido a la disminución en los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) que ocasionan acumulación de calor y por consiguiente un aumento en la temperatura máxima promedio que alcanza el lecho de fermentación, de 37° C para la corrida A hasta 42° C para la corrida B. Este aumento de temperatura es el factor que más afecta negativamente la actividad enzimática

### 6.3.5.2 Efecto de la circulación interna de aire por convección.

El uso de cambios dinámicos de aire (con pulsaciones de presión de aire y circulación interna de aire) fue propuesto previamente (Chen y col., 2002; Xu y col., 2002; Chen y col., 2005) para incrementar la transferencia de masa (agua) y calor, pero los coeficientes involucrados en el proceso no fueron evaluados por consiguiente no fueron desarrollados

modelos matemáticos para la predicción de la temperatura y contenido de humedad del lecho de fermentación en esos trabajos.

El efecto de la circulación interna de aire puede observarse al comparar los resultados de las corridas B y C (Tabla 6.15).

**Tabla 6.15** Coeficientes y mecanismos de transferencia de calor del modelo.

	Corridas	
	B	C
$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	1.04 ± 0.39 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.98 <sup>a</sup>
$U_t$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	4.22 ± 1.76 <sup>b</sup>	6.95 ± 1.78 <sup>b</sup>
$h_c$ (W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	5.61 ± 2.69 <sup>c</sup>	11.3 ± 4.97 <sup>c</sup>
$Q_{\text{met}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> )	1813.55	1929.65
$Q_{\text{evap}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-919.67	-1026.08
$Q_{\text{sen}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-834.69	-841.13
$W_{\text{evap}}$ (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.381	0.424
Pérdida de agua (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	0.238	0.250
$W_{\text{met}}$ (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> )	0.078	0.092

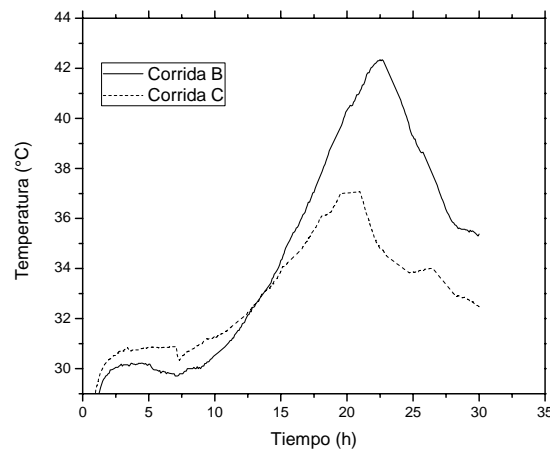
<sup>a,b,c</sup> Misma letra indica que no hay diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ )

El incremento de la circulación interna del biorreactor ( $N_{\text{Re}} = 2839$ ) aumenta los coeficientes de transferencia de calor,  $U_t$  y  $h_c$ , 65 y 101%, respectivamente, comparado con los obtenidos sin circulación interna forzada de aire,  $N_{\text{Re}} = 2.5$ . El incremento en estos coeficientes fue debido a la reducción de la resistencia a la transferencia de calor desde el lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor, mejorando la remoción de calor metabólico. El coeficiente de transferencia de masa ( $k_m$ ) aumentó 106%.

En los procesos de FMS es deseable aumentar la remoción de calor desde el lecho de fermentación mientras se mantenga constante el nivel de contenido de agua en el lecho. Aumentar el gasto o suministro de aire del reactor de charolas facilita la remoción de calor, pero lamentablemente ocasiona secado del lecho. El uso de ventiladores para favorecer la circulación interna de aire en el “headspace” en el biorreactor permitió la remoción de una mayor cantidad del calor metabólico sin aumentar la alimentación de aire que ocasiona secado.

El uso de ventiladores para promover la circulación interna de aire por convección en el “headspace” del biorreactor puede ser fácilmente lograda sin modificación o rediseño de biorreactores ya construidos.

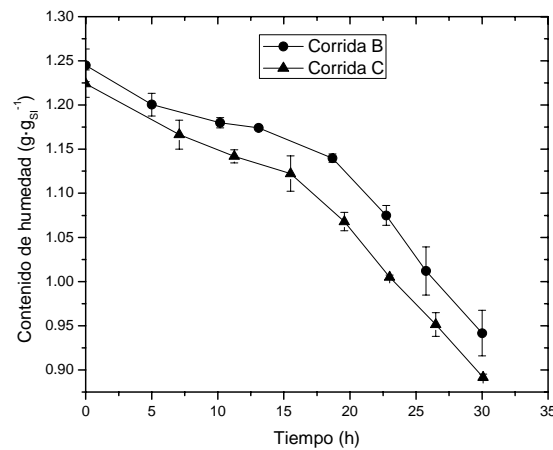
El efecto del  $N_{Re}$  sobre la temperatura del lecho de fermentación se observa en la Figura 6.41.



**Figura 6.41** Temperatura promedio del lecho de fermentación para las corridas B y C.

El aumento en el  $N_{Re}$  del “headspace” del biorreactor provoca un aumento en  $U_t$  resultando en una menor acumulación de calor en el lecho de fermentación como se observa en la Figura 6.41 y por consiguiente evita el aumento en la temperatura del lecho de fermentación. De tal forma que la temperatura máxima promedio observada en las fermentaciones, pasa de 42° C en la corrida B a 37° C en la corrida C.

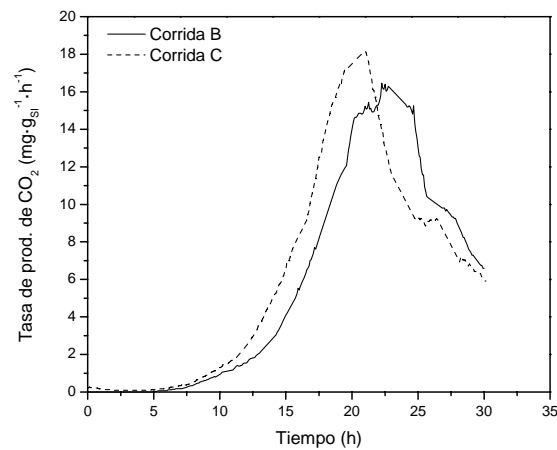
El contenido de agua final del lecho de fermentación para las corridas B y C se muestra en la Figura 6.42.



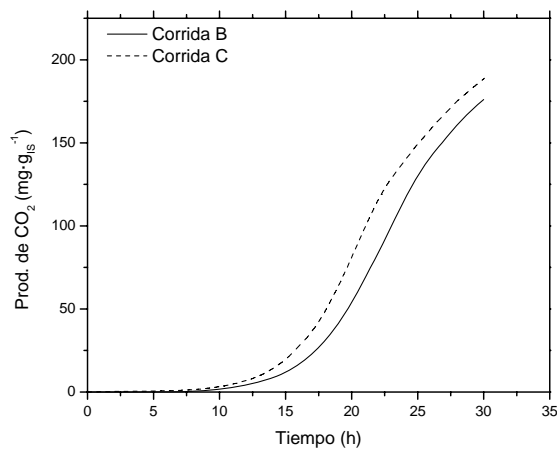
**Figura 6.42** Contenido de humedad promedio del lecho de fermentación para las corridas B y C.

El contenido de agua final del lecho de fermentación fue menor en la corrida C que en la corrida B lo cual es causado por la alta tasa de evaporación observada en la corrida C. Aunque se observa mayor generación de agua metabólica en la corrida (Tablas 6.13 y 6.15), ésta no fue suficiente para remplazar el agua evaporada, en contraste con reportes previos (Mitchell y col., 2003; Smits y col., 1999; Mitchell y col., 2006). Además los perfiles obtenidos de contenido de humedad para las corridas B y C son prácticamente paralelos, observándose una disminución anticipada en el contenido de humedad de la corrida C debido a que presenta un mayor coeficiente de  $k_m$ .

En las Figuras 6.43 y 6.44 se muestran las tasas y los perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  para las corridas B y C.



**Figura 6.43** Tasas de producción de CO<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.

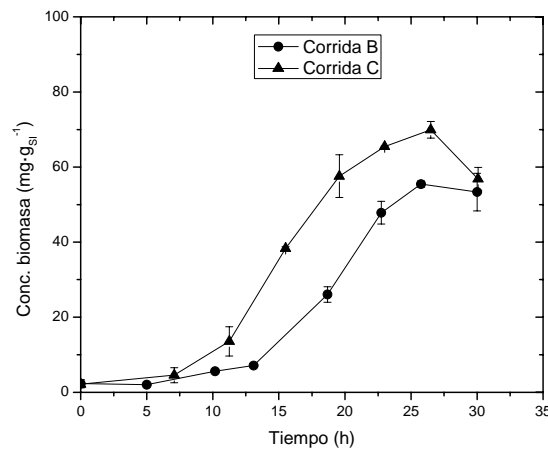


**Figura 6.44** Producción de CO<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de operación para las corridas B y C.

Bajo condiciones de circulación forzada de aire, las tasas de producción de CO<sub>2</sub> (corrida C) fueron más grandes (Figura 6.43) que aquellas obtenidos sin aireación forzada. También se observa mayor producción de CO<sub>2</sub> en la corrida C que en la corrida B (Figura 6.44). Debido a que se aumenta la remoción de calor al aumentar los coeficientes de

transferencia de calor y masa (agua). En las Figuras 6.43 y 6.44 se observa que para la corrida C la máxima tasa de producción de  $\text{CO}_2$  se presenta a las 21 horas de fermentación, es decir, una hora y media antes que para la corrida B. Esto puede deberse a que el uso de ventiladores para aumentar el  $N_{\text{Re}}$ , mejoró la transferencia de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ , en el lecho de fermentación, además que se redujo el efecto de la temperatura favoreciendo el metabolismo del microorganismo. Este mismo efecto se observó en el perfil de temperaturas para la corrida B.

En la Figura 6.45 se presenta la producción de biomasa en el lecho de fermentación para las corridas B y C.

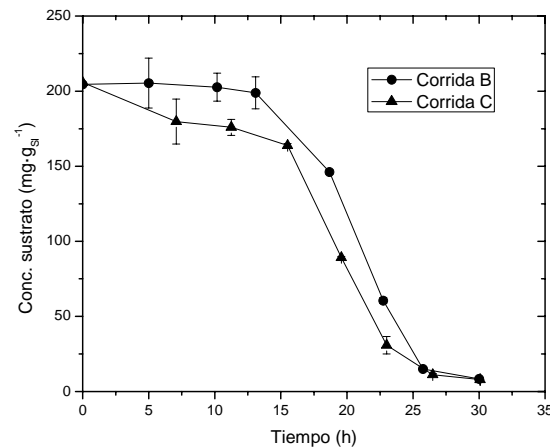


**Figura 6.45** Producción de biomasa bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.

Para la producción de biomasa (Figura 6.45) se observa un comportamiento similar al observado para la producción de  $\text{CO}_2$ , pero más pronunciado. Se observa que entre las 15 y 20 horas de fermentación la biomasa producida en la corrida C es prácticamente el doble que la observada en la corrida B. Sin embargo una vez que en la corrida C se alcanzó un máximo de concentración de biomasa a las 26.5 h, esta comienza a descender hasta un valor similar al encontrado en la corrida B. Esto puede ser posible debido a un consumo más rápido del sustrato y por consiguiente su agotamiento, lo que provoca que la biomasa deje de producirse

y comience un fenómeno de lisis y proteólisis. Sin embargo el valor máximo de biomasa durante las fermentaciones fue mayor en la corrida C que en la corrida B.

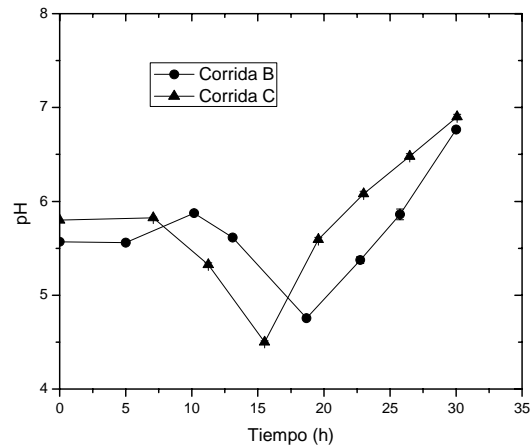
El consumo de sustrato durante las fermentaciones de las corridas B y C se presenta en la Figura 6.46.



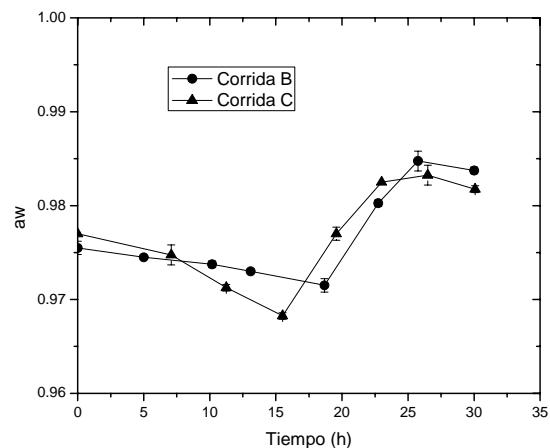
**Figura 6.46** Consumo de sustrato bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.

En la Figura 6.46 se puede observar que en la corrida C hay un mayor consumo de sustrato en las primeras horas de la fermentación. Esto coincide con lo observado en la producción de CO<sub>2</sub> y biomasa (Figuras 6.44 y 6.45) y nos señala que en la corrida C se presenta una mayor actividad del microorganismo que en las corridas B. Lo anterior nos indica que el aumento en el  $N_{Re}$  favorece no solo la transferencia de calor si no también la transferencia de masa hacia el lecho de fermentación, permitiendo una mejor transferencia de O<sub>2</sub> del “headspace” al lecho de fermentación y mejor remoción del CO<sub>2</sub> formado.

En las Figuras 6.47 y 6.48 se muestran los perfiles de pH y  $a_w$  en el lecho de fermentación.



**Figura 6.47** Perfiles de pH bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.



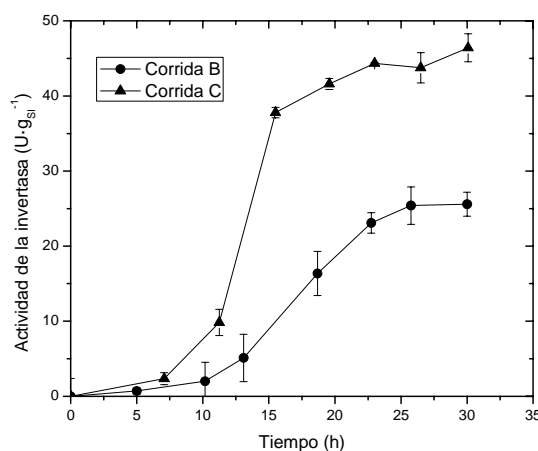
**Figura 6.48** Perfiles de  $a_w$  bajo diferentes condiciones de operación de las corridas B y C.

En los perfiles de pH y  $a_w$  (Figuras 6.47 y 6.48) se observa que aunque los perfiles son similares, el tiempo en el que se presentan los valores mínimos para la corrida C se presenta 3 horas antes. Es decir los perfiles de pH y  $a_w$  de la corrida C son más similares a los presentados para la corrida A. Esto quiere decir que las limitaciones en la transferencia de calor y masa (agua) provocados por el aumento de la altura del lecho de fermentación son evitadas al provocar la circulación interna de aire por convección forzada al interior del



“headspace” del biorreactor. El hecho de que los perfiles de pH y  $a_w$  para los experimentos sean muy similares, es un indicativo de que el microorganismo presenta un metabolismo semejante en todos los experimentos. Tanto el pH como la  $a_w$  presentan valores mínimos en los mismo tiempos durante la fermentación, esto se debe a que ambos dependen de la concentración de metabolitos intermediarios producidos. En el caso particular del pH, presenta un valor mínimo debido a la liberación de ácido cítrico durante la fermentación.

En la Figura 6.49 se presenta el efecto del  $N_{Re}$  sobre los perfiles de actividad enzimática de la invertasa medida en los lechos de fermentación para las corridas B y C.



**Figura 6.49** Perfiles de actividad enzimática (invertasa) bajo diferentes condiciones de operación para las corridas B y C.

El aumento del  $N_{Re}$  en el “headspace” del biorreactor tiene un efecto positivo en la actividad enzimática (Figura 6.49), al aumentar prácticamente un 100% en la corrida C con respecto a la corrida B.

Es importante notar que las corridas A y C presentaron prácticamente la misma temperatura máxima promedio durante la fermentación (37° C) y que presentan valores prácticamente idénticos de actividad enzimática (invertasa).

### 6.3.6 Validación del modelo.

Los coeficientes de transferencia de masa (agua) y calor estimados experimentalmente fueron usados en el modelo matemático propuesto en este trabajo. La comparación de los valores experimentales de temperatura ( $T_b$ ) y contenido de agua del lecho de fermentación ( $W_b$ ) con los valores predichos por las Ecs. (8) y (15) validaron el modelo propuesto. Datos experimentales y predichos para los balances de calor y de agua, de temperatura y contenido de agua del lecho de fermentación son mostrados en la Tabla 6.16 y también pueden ser observados en las Figuras 6.50 y 6.51.

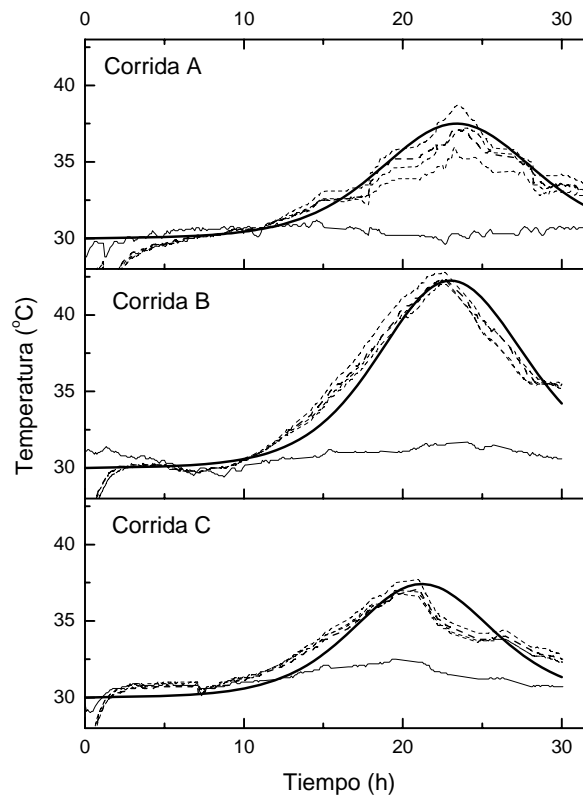
**Tabla 6.16** Valores experimentales calculados y obtenidos por el modelo de los elementos del balance de calor.

	Corridas		
	A	B	C
$Q_{\text{evap}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	-980.11	-919.67	-1026.08
$Q_{\text{evap}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-958.63	-814.61	-924.39
Error en predicción de $Q_{\text{evap}}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-2.19	-11.42	-9.91
$Q_{\text{sen}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance de energía	-1118.84	-834.69	-841.13
$Q_{\text{sen}}$ (J g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	-1181.70	-970.69	-978.53
Error en predicción de $Q_{\text{sen}}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	5.62	16.29	16.34
$W_{\text{evap}}$ (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) calculado por el balance	0.405	0.381	0.424
$W_{\text{evap}}$ (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) predicho por el modelo	0.396	0.339	0.381
Error en predicción de $W_{\text{evap}}$ desde el lecho <sup>a</sup> (%)	-2.22	-11.02	-10.14
Pérdida de agua (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) por humedades medidas	0.308	0.238	0.250
Pérdida de agua (g g <sub>SI</sub> <sup>-1</sup> ) predicha por el modelo	0.302	0.259	0.287
Error en predicción de pérdida de agua desde lecho (%)	-2.05	8.96	14.77

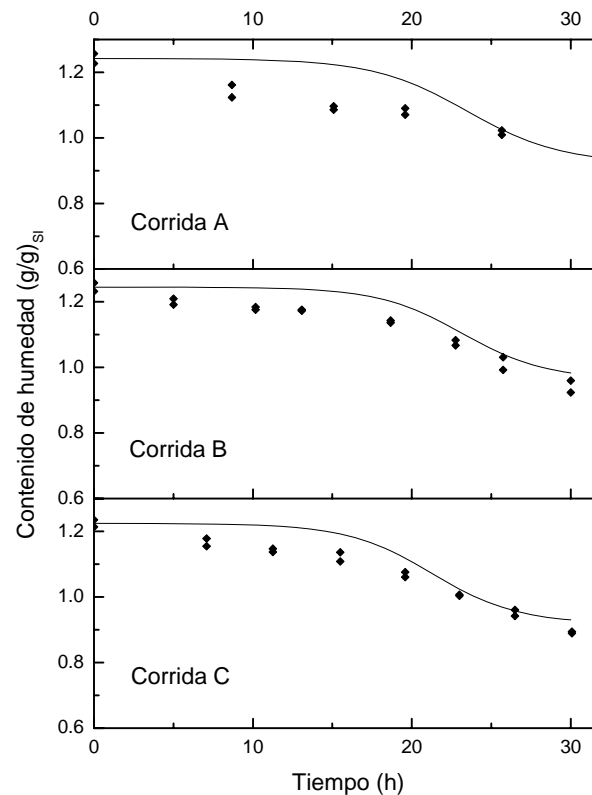
<sup>a</sup>Error = 100 × (predicho – medido) / medido

La Tabla 6.16 se muestran muy pequeños errores de predicción para los valores totales de  $Q_{\text{evap}}$ ,  $Q_{\text{sen}}$ ,  $W_{\text{evap}}$  y pérdida de agua. Esto respalda la decisión de promediar los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) solo para aquellos intervalos donde la transferencia de calor y masa (agua) fue del lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor.

En las Figuras 6.50 y 6.51 se presenta los perfiles de temperatura y contenido de agua del lecho de fermentación experimentales y predichos por el modelo, respectivamente.



**Figura 6.50** Temperatura del lecho de fermentación (líneas discontinuas) temperatura del “headspace” (línea continua delgada) y valores predichos de temperatura (línea continua gruesa). Para las corridas A, B y C.



**Figura 6.51** Contenido de humedad del lecho de fermentación. Datos experimentales (puntos) y predicciones del modelo (líneas). Para las corridas A, B y C.

Se observa en las Figuras 6.50 y 6.51 que hay buen ajuste entre los valores experimentales y predichos por el modelo de la temperatura y el contenido de agua del lecho de fermentación. El análisis estadístico encontró que para las temperaturas, el coeficiente de correlación de Pearson tuvo valores entre 0.879 y 0.967, y para el contenido de humedad este coeficiente de correlación tuvo valores entre 0.886 y 0.971 respectivamente.

Los datos presentados en la Tabla 6.16 y las Figuras 6.50 y 6.51 validan el modelo propuesto (Ec. 8 y 15). Las predicciones del modelo ajustan razonablemente bien con los valores experimentales; sin embargo son visibles algunas desviaciones. Con respecto a la temperatura del lecho de fermentación ( $T_b$ ) (Figura 6.50), los valores predichos ajustan con los valores experimentales. Para el contenido de agua ( $W_b$ ) (Figura 6.49), las predicciones ajustan

con los valores experimentales, sin embargo, aunque el ajuste no es tan bueno como el que se tiene para la temperatura, se observa la misma tendencia entre las predicciones del modelo y los valores experimentales. Esto puede ser explicado por la naturaleza de las mediciones, en línea para la temperatura y fuera de línea para el contenido de agua en el lecho de fermentación.

Para la corrida A hay un buen ajuste en las temperaturas predichas con los valores obtenidos experimentalmente. Sin embargo para las corridas B y C se observó un ligero retardo (menos de una hora) en el modelo (Figura 6.50). Ésta desviación puede deberse por: i) desviaciones por la cinética de producción de  $\text{CO}_2$  a partir de la ecuación logística al inicio de la fermentación (fase lag); o ii) desviación de los valores predichos causado por el secado del lecho durante las primeras etapas de la fermentación, debido a que la temperatura del lecho es menor que la temperatura del aire en el “headspace” del biorreactor. Mejores resultados son encontrados cuando la transferencia de calor ocurre desde el lecho de fermentación hacia el aire en el “headspace” del biorreactor.

### **6.3.7 Conclusiones parciales del estudio con soporte inerte**

La estrategia presentada en esta parte del trabajo permitió la evaluación cuantitativa del efecto de la altura del lecho de fermentación y la circulación interna forzada de aire en un biorreactor de charolas para FMS sobre la remoción de calor metabólico y evaluar el efecto de esas variables de operación sobre los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua).

El uso de un soporte inerte y el muestro a intervalos regulares permitió la medición de variables tales como el contenido de humedad del lecho, la producción de biomasa y consumo de sustrato necesarias para los balances integrales de calor y masa (agua), a partir de los cuales fue posible estimar los coeficientes de transferencia de calor durante la fermentación.

El aumento en la velocidad de circulación de aire (de un  $N_{Re}$  de 2.5 a 2839) mejoró la remoción de calor metabólico sin un secado significativo del lecho de fermentación.

El modelo matemático propuesto usando los coeficientes de transferencia obtenidos por los balances de calor y masa (agua) predijeron adecuadamente los perfiles de temperatura y contenido de humedad final en el lecho durante el proceso de fermentación.

El modelo puede ser usado para optimizar el diseño y las condiciones de operación, tales como la altura del lecho de fermentación y las velocidades de circulación del aire de biorreactores de charola para FMS.

## 7 DISCUSIÓN GENERAL

Los coeficientes estequiométricos para los estudios en soporte-sustrato y soporte inerte fueron obtenidos de distinta manera. Los coeficientes estequiométricos para los estudios en soporte-sustrato fueron obtenidos a partir de un balance estequiométrico de la biorreacción propuesta mediante balances elementales resueltos algebricamente. Aunque los coeficientes estequiométricos obtenidos no fueron medidos experimentalmente los resultados obtenidos por el modelo mostraron que la biorreacción propuesta fue adecuada. Sin embargo esto puede ser causa de las variaciones que se reflejan en el ajuste de los valores experimentales de temperatura y contenido de humedad final con los valores obtenidos por el modelo.

En el caso de los estudios con soporte inerte se midió la producción de biomasa y consumo de sustrato de cada corrida para calcular los coeficientes estequiométricos de rendimiento de la biorreacción propuesta, obteniéndose coeficientes estequiométricos de rendimientos particulares para cada corrida que fueron usados en el modelo matemático propuesto, permitiendo un mejor ajuste entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo para los perfiles de temperatura y contenido de humedad.

En los estudios en soporte-sustrato y en soporte inerte se observó que la generación de agua metabólica ( $W_{met}$ ) no contribuye significativamente en el contenido de agua del lecho de fermentación y tampoco es suficiente para remplazar el agua perdida por evaporación del lecho de fermentación durante las corridas realizadas.

A diferencia de trabajos previos, donde la evaporación de agua del lecho de fermentación ha sido despreciada o considerada como un proceso difusivo (Smits y col., 1999; Khanahmadi y col., 2004), en el presente trabajo fue considerada como un proceso convectivo afectado por las condiciones de flujo de aire ( $N_{Re}$ ) a través del “headspace” del biorreactor de charolas con un coeficiente convectivo de transferencia de masa.

El presente trabajo muestra la importancia de realizar balances integrales de agua en los procesos de FMS a fin de estimar coeficientes convectivos de transferencia de masa que no

habían sido considerados previamente (Mitchell y col., 2003). Y que de acuerdo con resultados obtenidos en los estudios con soporte inerte, la realización de balances integrales parciales del calor y masa (agua) durante la fermentación permite una mejor estimación de los coeficientes de transferencia de calor ( $U_t$  y  $h_c$ ) y masa ( $k_m$ ) del proceso.

En trabajos previos (Rajagopalan y Modak, 1994 y 1995; Smits y col., 1999; Khanahmadi y col., 2004) los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) usados en los modelos propuestos fueron obtenidos de valores o correlaciones reportadas en otras fuentes bibliográficas. Los coeficientes de transferencia de calor usados corresponden a materiales similares pero no los mismos (Rajagopalan y Modak, 1994 y 1995; Smits y col., 1999) o fueron obtenidos a partir de correlaciones usadas para operaciones de secado con aire (Khanahmadi y col., 2004), que presenta diferencias inherentes con los procesos de FMS, ya que en éstos el calor es generado en el lecho de fermentación por la actividad microbiana y no por la corriente de aire usada en los proceso de secado. Esto puede causar sub o sobre-estimación de los coeficientes de transferencia de calor que a su vez puede provocar que exista un mal ajuste entre los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente de las variables estudiadas (temperatura y contenido de humedad del lecho de fermentación).

La estrategia usada para estimar el coeficiente de transferencia de calor es similar a la usada en un trabajo previo; sin embargo, Nagel y col. (2001) combinaron el coeficiente de transferencia de calor y el área de transferencia de calor en un solo parámetro, ya que debido al diseño del reactor en su estudio (reactor de FMS agitado por paletas) era difícil calcular el área de transferencia. En contraste, el empleo de un biorreactor de charolas para FMS en este trabajo permitió el diseño y medición del área de transferencia de calor, entonces los coeficientes de transferencia de calor y masa pueden ser estimados con mayor precisión.

El presente estudio propone balances integrales de calor y agua para estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua). En el caso de los estudios con soporte-sustrato solo pudieron calcularse coeficientes totales de transferencia de calor y masa (agua) ya que, para mantener las condiciones asépticas durante la fermentación no fue posible la toma de muestras. Solo se pudieron emplear los valores iniciales y finales de cada una de las



corridas realizadas en el modelo propuesto. Esto provocó la sub o sobre-estimación de los coeficientes de calor y masa (agua) de las corridas con soporte-sustrato. En el caso de los estudios con soporte inerte los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) parciales (o individuales) obtenidos para cada intervalo de tiempo entre muestreo permitieron la evaluación de los coeficientes de transferencia durante varias etapas de cada corrida por lo que se pudo calcular coeficientes de transferencias de calor y masa (agua) promedio para cada corrida.

Los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) obtenidos en los estudios con soporte-sustrato fueron menores a los obtenidos en los estudios con soporte inerte. Esto se debe a la rapidez o velocidad con la que se acumula el calor en el lecho de fermentación que a su vez depende de la velocidad de crecimiento del microorganismo, ya que los bajos coeficientes de transferencia de calor en las fermentaciones con soporte-sustrato se debieron al lento crecimiento del microorganismo (120 h) que provocó una lenta acumulación de calor. Lo anterior hace posible mayores errores de estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) en las fermentaciones con soporte-sustrato.

Lo anterior hace evidente la necesidad de diseñar metodologías que permitan la toma de muestras en biorreactores de charolas para FMS en soporte-sustrato sin ocasionar contaminación del medio de fermentación para poder estimar con mayor precisión los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua).

En los procesos de FMS es deseable incrementar la remoción de calor metabólico desde el lecho de fermentación al “headspace” del biorreactor, mientras se mantenga un nivel constante de contenido de agua en el lecho, aumentando el suministro de aire del biorreactor de charolas facilita la remoción de calor, pero lamentablemente esto causa el secado del lecho. El uso de ventiladores para favorecer la circulación interna de aire en el “headspace” del biorreactor permitió la remoción de una cantidad más grande de calor metabólico, sin aumentar el suministro de aire que causa secado.

Es importante notar que el aumento en la velocidad de circulación de aire (de un  $N_{Re}$  de 2.5 a 2839) mejoró la remoción de calor metabólico en los estudios con soporte inerte. Aunque se observó una mayor pérdida de agua en la corrida C con respecto a las otras 2 corridas estudiadas la pérdida de agua no tuvo un efecto negativo sobre la tasa de producción de  $CO_2$ . En el caso de los estudios en soporte-sustrato el aumento en el  $N_{Re}$  provocó un aumento en la actividad enzimática relativa de la fitasa, sin embargo manejar  $N_{Re}$  muy altos provocó una disminución en la actividad enzimática relativa. Además el aumento en el  $N_{Re}$  afecta negativamente la producción de  $CO_2$  debido al secado del lecho de fermentación. Siendo necesario encontrar un valor de  $N_{Re}$  óptimo. El uso de ventiladores para promover la circulación interna de aire por convección en el “headspace” fue fácilmente lograda sin la modificación o el rediseño de biorreactores ya construidos.

## 8 CONCLUSIONES

Los balance integrales de calor y masa permitieron estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa en el lecho de fermentación lo que sirvió para construir un modelo matemático para la estimación de los perfiles de temperatura y contenido de humedad en un biorreactor de charolas para FMS.

Los resultados muestran que para tener una estimación más precisa de los coeficientes de transferencia de calor y de masa es necesario hacer un número adecuado de balances de energía y masa durante la fermentación que implicaría la toma de muestras durante la misma.

El modelo matemático propuesto, empleando los coeficientes de transferencia de calor y masa (agua) obtenidos en los balances de energía y masa, permitió obtener predicciones adecuadas de los perfiles de temperatura y contenido de humedad del lecho de fermentación.

El modelo matemático propuesto puede ser usado como una herramienta útil para optimizar el diseño y condiciones de operación de los procesos de fermentación en medio sólido en biorreactores de charolas, tales como la altura del lecho y las velocidades de circulación del aire en el “headspace” del biorreactor.

La estrategia presentada en este trabajo permitió evaluar cuantitativamente el efecto de la altura del lecho de fermentación y de la circulación interna forzada de aire en el “headspace” de un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido.

El incremento de la tasa de circulación interna forzada del aire mejoró la remoción de calor sin ocasionar gran pérdida de humedad del lecho de fermentación; sin embargo, niveles muy altos ocasionaron pérdidas de humedad, por lo que un valor óptimo de la circulación de aire ( $N_{Re}$ ) debe ser encontrado.

En nuestro conocimiento, el presente trabajo es el primero en describir el efecto del número de Reynolds ( $N_{Re}$ ) de la fase gaseosa (“headspace”) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido sobre los coeficientes de transferencia de calor y masa.

Las actividades enzimáticas estudiadas (invertasa y fitasa) fueron afectadas en mayor medida por la temperatura del lecho de fermentación que por el contenido de humedad del mismo y otras variables medidas durante las fermentaciones.

---

## 9 REFERENCIAS

- 1 Acke L.W. (1969). Water activity and enzyme activity. *Food Tech.* **23**: 1257- 1270.
- 2 Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. and Favela-Torres E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 808-814.
- 3 Aidoo K.E., Hendry R. and Wood B.J.B. (1984). Mechanized fermentation systems for the production of experimental soy sauce koji. *J. Ferment. Tech.* **19**: 389-398.
- 4 Atkinson B. and Mavituna F. (1991). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Second Edition. Ed. Stockton Press. UK. pp: 794-816.
- 5 Arora D.K., Mukerji K.G. and Marth I. (1991). *Handbook of applied mycology*. Vol. 3. Food and feeds. Cap 15, Marcel Dekker Inc. pp: 445-449.
- 6 Ashok KB., Kayal V.N. and Gunasekaran P. (2001). Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* un submerged and solid state fermentation. *Process Biochem.* **36**: 1241-1247.
- 7 Auria R., Ortiz I., Villegas E. and Revah S. (1995). Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentation. *Process Biochem.* **8**: 751-756.
- 8 Bailey J.E. and Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition Ed. Mc-Graw Hill Singapore. pp: 292-296, 512-522.
- 9 Bajracharya R. and Mudgett R.E. (1979). Solid-substrate fermentation of alfalfa for enhanced protein recovery. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 551-560.
- 10 Bajracharya R. and Mudgett R.E. (1980). Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 2219-2235.
- 11 Baldensperger J., Mer J., Hannibal L. and Quinto P.J. (1985). Solid state fermentation of banana wastes. *Biotechnol. Lett.* **7**: 743-748.
- 12 Barstow L.W., Dale B.E. and Tengerdy R.P. (1988). Evaporative moisture and temperature control in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Tech.* **2**: 233-236.
- 13 Bauer W. and Rottenbacher L. (1985). Utilisation des lits fluidisés gaz-solide en biotechnologie: Application a la production d'ethanol par fermentation. *Entropie.* **21**: 18-23.
- 14 Biddlestone A.J. and Gray K.R. (1985). Composting. In *Comprehensive biotechnology*, vol. 4. Editor-in-chief M. Moo-Young. Pergamon Press, New York. pp: 1059-1070.
- 15 Bird R.B., Stewart W.E. and Lightfoot E.M. (1960). *Transport phenomena*. John Wiley and Sons, New York.

- 
- 16 Blanch, H.W. and Clark, D.S. (1997). *Biochemical engineering*. Ed. Malcer Dekker, Inc. New York, U.S.A. pp: 162-171, 427-431.
  - 17 Brenes J., Viveros A., y Brenes A. (2002). Las enzimas en nutrición porcina (II). *Prod. Anim.*, Año XVII **181**: 4-18.
  - 18 Cannel E. and Moo-Young M. (1980). Solid-state fermentation systems. *Process Biochem.* **15**: 2-7.
  - 19 Carlson M. (1987). Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces species*. *J. Bacteriol.* **169**: 4873-4877.
  - 20 Carrizalez V., Rodríguez H. and Sardina I. (1981). Determination of the specific growth rate of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 321-333.
  - 21 Chen H.Z., Xu F.J., Tian Z.H. and Li Z.H. (2002). A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **93**: 211-214.
  - 22 Chen H.Z., Xu F.J. and Li Z.H. (2005). Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. *Biochem. Eng. J.* **23**:117-122.
  - 23 Chen W. and Liu C. (1996). Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicas*. *Enzym Microb Tech.* **18**:153-160.
  - 24 Choi Y. and Okos M.R. (1987). Effects of temperature and composition on thermal properties of foods. In: *food engineering and process applications*. Ed. M. Le Maguer & P. Jelen Vol. 1 Elsevier Applied Science Publishers, New York. pp: 93-102.
  - 25 Considine P.J., Hackett T.J. and Coughlan M.P. (1987). Solid-state cultivation of *Penicillium capsilatum* on beet pulp. *Biotechnol. Lett.* **9**: 131-134.
  - 26 Cooney C.L. (1981). Growth of microorganism. In *Biotechnology*, vol 1. Ed. H. J. Rehm and G. Reed. Verlag Chemie Weinheim. pp: 73-112.
  - 27 Cooney C.L. and Wang D.I.C. (1968). Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial grown. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 269-281.
  - 28 Decker C.H, Visser J. and Schreie P. (2000). B-glucosidades from five black *Aspergillus* species: Study of their physo-chemical and biocatalytic properties. *J. Agr. Food Chem.* **48**: 4929-4936.
  - 29 Deschamps F. and Huet M.C. (1985). Xylanase production in solid-state fermentation: A study of its properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 177-180.

- 
- 30 Deschamps F., Giuliano C., Asther M., Huet M.C. and Roussos S. (1985). Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1385-1388.
- 31 Doelle H.W., Mitchell D.A. and Rolz C.E. (1992). Solid substrate cultivation. Ed. Elsevier Applied Science, Londol. New York
- 32 Durand A. (2003). Bioreactors design for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**:113-125.
- 33 Durand A. and Chereau D. (1988). A new pilot reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 476-786.
- 34 Durand A., de la Broise D. and Blachere H. (1988). Laboratory scale bioreactor for solid state process. *J. Biotechnol.* **8**: 59-66.
- 35 Durand A., Renaud R., Maratray J., Almanza S. and Dies M. (1996). INRA-Dijon reactor for solid state fermentation: designs and applications. *J. Sci. Ind. Res.* **55**: 317-332.
- 36 Edgar T.F. and Himmelblau D.M (1988). Optimization of chemical processes. MacGraw-Hill, New York, USA. pp: 34-50
- 37 Erickson L.E., Minkevich I.G. and Eroshin V.K. (1978) .Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 1595-1621.
- 38 Eykhoff P. (1974). *System identification*. Wiley-Interscience, New York.
- 39 Favela-Torres E., García-Rivero M., Córdova-López J., Roussos S., Viniegra-González G., Guitérrez-Rojas M., Saucedo-Castañeda G., Gunasekaran P. and Huerta-Ochoa S. (1997). Kinetics of *Aspergillus niger* growth at high glucose concentrations in different types of the culture. In *Advances in solid state fermentation*. Vol. 5. Edit. Roussos S., Lonsabe B.K., Raimbault M., Viniegra-González G. Kluwer Academic Publishers. pp: 49-58.
- 40 Finger S.M., Hatch R.T. and Regan T.M. (1976). Aerobic microbial growth in semisolid matrices: heat and mass transfer limitation. *Biotechnol. Bioeng.* **18**: 1193-1218.
- 41 Frisvad J.C., Hawksworth D.L., Kozakiewicz Z., Pitt J. I., Samsom R.A. and Stolk A.C. (1990). In Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. R. A. Samsom and J.I. Pitte Edit. Plenum Press New York. pp: 83-88.
- 42 Gautam P., Sabu A., Pandey A., Szakacs G. And Soccol S.R. (2002). Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresour. Technol.* **83**: 229-233.
- 43 Geankoplis C.J. (1998). Secado de materiales de proceso. En *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. CECSA, México. pp: 579-649.
-

- 
- 44 Gervais P. (1989). New sensor allowing continuous water activity measurement of submerged or solid-substrate fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 266-271.
- 45 Gervais P. and Battut G. (1989). Influence of water potential on Q-decalactone production by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2939-2943.
- 46 Gervais P. and Bazelin C. (1986) Development of a solid substrate fermenter allowing the control of the substrate water activity. *Biotechnol. Lett.* **8**: 191-196.
- 47 Gervais P. and Bensoussan M. (1994). Solid-state fermentation of the genus *Aspergillus*. In *Aspergillus*. Vol 5. Edit. Smith J.E. Plenum Press. pp:101-140.
- 48 Gervais P., Marechal P.A. and Mollin P. (1996). Water relations of solid state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* **55**: 347-357.
- 49 Gibson D.M. (1987). Production of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* on starch media. *Biotechnol. Lett.* **9**: 305-310.
- 50 Gowthaman M.K., Ghildyal N.P., Raghava Rao K.S. and Karanth N.G. (1993) Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid state fermentors. The effect of gaseous concentration gradients. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **56**: 233-239.
- 51 Grajek W. (1987). Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 126-129.
- 52 Grajek W. and Gervais P. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzym. Microb. Tech.* **9**: 658-662.
- 53 Grant G.A., Han Y.W and Andersen A. W. (1978). Pilot-scale semisolid fermentation of straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 549-553.
- 54 Griffin D.M. (1981) Water and microbial stress. *Adv. Microb. Ecol.* **5**: 91-136.
- 55 Ghildyal N.P., Ramakrishna M., Lonsane B.K., Karanth N.K. and Krishnaiah M.M. (1993). Temperature variations and amyloglucosidase level at different bed depths in solid state fermentation systems. *Chem. Eng. J.* **51**: B17-B23.
- 56 Gutiérrez-Rojas M., Auria R., Benet J. and Revah S. (1995). A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. *Chem. Eng. J.* **60**:189-198.
- 57 Gutiérrez-Rojas M., Hosn S.A.A., Auria R., Revah S. and Favela-Torres E. (1996). Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochem.* **31**(4): 363-369.
- 58 Hall C.A.S and Day J.W. (1997). Systems and models: terms and basic principles. In *Ecosystem modeling in theory and practice: An introduction with case histories*. Eds. Hall C.A.S. and Day J.W. John Wiley & Son. New York. pp: 6-36.
-



- 
- 59 Hanh-Hagerdal B. (1986). Water activity: A possible external regulator in biotechnical processes. *Enzym. Microb. Tech.* **8**: 322-327.
- 60 Han Y. W. (1987). Oxygen requirement for growth of *Candida utilis* on semisolid straw substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 672-674.
- 61 Han I.Y. and Steinberg M.P. (1986) Solid-state yeast fermentation of raw corn with simultaneous koji hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 449-462.
- 62 Han Y.W., Gallagher D.J. and Wilfred A.G. (1987). Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. *J. Ind. Microbiol.* **2**: 195-200.
- 63 Han Y.W. and Wilfred A.G. (1988). Hydrolysis of phytate in soybean and cottonseed meals by *Aspergillus ficuum* phytase. *J. Agr. Food Chem.* **36**: 259-262.
- 64 Hesseltine C.W. (1977). Solid-state fermentation – Part 1. *Process Biochem.* **12**(6): 24-27.
- 65 Hesseltine C.W. (1981). Future of fermented food. *Process. Biochem.* **16**: 2-6
- 66 Hesseltine C.W. (1987). Solid state fermentation an overview. *Int. Biodeterior.* **23**:79-89.
- 67 Himmelblau D.M. (1996). *Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering*. 6<sup>th</sup> Ed. Englewood Cliffs, N.J, Prentice Hall, USA.
- 68 Holman J.P. (1998). Transferencia de calor. 8<sup>a</sup> Edición. Ed Mc Graw Hill. Madrid España. pp: 160-167.
- 69 Hong K., Tanner R.D., Crooke P.S. and Malaney G.W. (1988). Semisolid state fermentation of bakers' yeast in an air-fluidized bed fermentor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **18**: 3-17.
- 70 Hoogschagen M., Zhu Y., As H., Tramper J. and Rinzema A. (2001). Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1183-1187.
- 71 Incropera F.P and DeWitt D.P. (1996). Fundamentos de transferencia de calor, Ed. Prentice Hall México D.F. pp: 348-358.
- 72 Jay J.M. (1986). *Modern Food Microbiology*, 3<sup>rd</sup> ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York. pp: 40-41.
- 73 Kargi F. and Moo-Young M. (1985). Transport phenomena in bioprocesses. In: *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 2 Ed. C.L. Cooney and A. Humphrey Pergamon Press Oxford UK. pp: 5-56.
- 74 Keen R.E and Spain J.D. (1992). Computer simulation in biology. In *A Basic introduction*. Wiley-Liss. New York, USA. pp: 1-16.
- 75 Kenyon C.P., Prior B.A. and van Vuuren H.J.J. (1986). Water relations of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: glycerol production under solute stress. *Enzym. Microb. Tech.* **8**: 461-464.
-

- 
- 76 Khanahmadi M., Roostaazad R., Mitchell D.A, Miranzadeh M., Bozorgmehri R. and Safekordi A. (2006). Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed soli-state fermentation. *Chem. Eng. Sci.* **61**: 5654-5663.
- 77 Khanahmadi M., Roostaazad R., Safekordi A., Bozorgmehri R. and Mitchell D.A. (2004). Investigating the use of cooling surfaces in solid-state fermentation tray bioreactors: Modeling and experimentation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **79**:1128-1242.
- 78 Kim J.H., Hosobuchi M. Kishimoto M., Seki T., Yoshida T., Taguchi H. and Ryu D.D.Y. (1985). Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1445-1450.
- 79 Klich M.A. and Bennet J.W. (1992). Ecology of the *Aspergillus* of solid and litter. *Aspergillus: Biología y aplicaciones industriales*. Ed. Butterwoth-Heinemann. Cap. 15.
- 80 Kozakiewicz Z. and Smith D. (1994). Physiology of *Aspergillus*. In *Aspergillus*. Vol 2, Edit. Smith J.E. Plenum Press. pp: 23-40.
- 81 Kumar P.K.R. and Lonsane B.K. (1987). Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnol. Lett.* **9**:179-182.
- 82 Kumar P.K.R. and Lonsane B.K. (1988). Batch and fed-batch solid-state fermentations: Kinetics of cell growth, hydrolytic enzymes production and gibberellic acid production. *Process Biochem.* **23**: 43-47.
- 83 Larroche C. (1996). Microbial growth and spulation behavior in solid state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* **55**: 408-423.
- 84 Larroche C., Moksia J. and Gros J.B. (1998). A convenient method for initial dry weight determination in samples from solid-state cultivations. *Process Biochem.* **33**: 447-451.
- 85 Laukevics J.J, Apsite A.F., Viesturs U.E. and Tengerdy R.P. (1984). Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1465-1474.
- 86 Levenspiel O. (1999). *Chemical reaction engineering*. 3<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc., USA, New York.
- 87 Lewis M.J. (1991). Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Editorial Acribia. Zaragoza España. pp: 231-232.
- 88 L'Hocine L., Wang Z., Jiang B. and Xu S. (2000). Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *J. Biotechnol.* **81**: 73-84.
- 89 Lindenfelser L.A. and Ciegler, A. (1975). Solid-substrate fermented for ochatoxin a production. *Appl. Microbiol.* **29**: 323-327.
-

- 
- 90 Loera O., Aguirre J. and Viniestra-González G. (1999). Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzym. Microb. Tech.* **25**: 103-108.
- 91 Lonsane B.K., Guildyal N.P., Budiartman S. and Ramakrishna S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzym. Microb. Tech.* **7**: 258-265.
- 92 Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- 93 McCabe W.L., Smith J.C. and Harriot P. (2000). Drying of Solids. In: *Unit operations of chemical engineering*, 6<sup>th</sup> Ed. McGraw Hill, USA. pp: 773-811.
- 94 Mildenhall J.P., Prior B.A. and Trollope L.A. (1981). Water relations of *Erwinia chrysanthemi*: Growth and extracellular pectic acid lyase production. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 27-34.
- 95 Minjares Carranco A., Trejo Aguilar B.A., Aguilar G. and Viniestra-González G. (1997). Physiochemical comparison between pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzym. Microb. Tech.* **21**: 25-31.
- 96 Minkevich I.G. and Eroshin V.K. (1973). Productivity and heat generation of fermentation under oxygen limitation. *Folia Microbiol.* (Prague). **18**: 376-385.
- 97 Mishra I.M., El-Temtamy S.A. and Schugerl K. (1982). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in gaseous fluidized beds. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 197-203.
- 98 Mitchell D.A., Berovic M. and Krieger, N. (2000a). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Adv. Biochem. Eng.* **68**: 61-138.
- 99 Mitchell D.A., Doelle H.W. and Greenfield P.F. (1988a). Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 598-602.
- 100 Mitchell D.A., Doelle H.W. and Greenfield P.F. (1988b). Improvement of growth of *Rhizopus oligosporus* on a model solid substrate. *Biotechnol. Lett.* **10**: 497-502.
- 101 Mitchell D.A., Krieger N. and Berovic M. (2006). Group I Bioreactors: Un-aerated and Unmixed. In: *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and Operation*. Ed. Mitchell, D.A., Krieger N. and Berovic M., Springer, Germany. pp: 65-76.
- 102 Mitchell D.A., Krieger N., Stuart D.M. and Pandey A. (2000b). New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochem.* **35**: 1211-1225.
-

- 
- 103 Mitchell D.A. and Lonsane B.K. (1992). Definition, characteristics and potential. In *Solid substrate cultivation*. Vol 1, Edit Doelle H., Mitchell D.A. and Rolz C.E. Elsevier Applied Science. pp: 1-16.
- 104 Mitchell D.A, Lonsane B.K., Durand A., Renaud R., Almanza S., Maratray J., Desgranes C., Crooke P.S., Hong K., Tanner R.D. and Malaney G.C. (1992). General Principles of Reactor Design and Operation for SSC. In: *Solid Substrate Cultivation*. Ed. Doelle, H. W., Mitchell D.A. and Rolz, C.E. Elsevier Applied Science, England. pp: 115-136.
- 105 Mitchell D.A., Nascimento-Cunha L.E., Lopes-Machado A.V., de Lima-Luz L.F. and Krieger N. (2010). A model-based investigation of the potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **48**:195-203.
- 106 Mitchell D.A., Pandey A., Sangsurasak P. and Krieger N. (1999). Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process Biochem.* **35**: 167-178.
- 107 Mitchell D.A., von Meien O.F. and Krieger N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: Heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **13**:137-147.
- 108 Montiel-González A.M., Fernández M.J, Viniegra-González G. and Loera O. (2002). Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **102**: 63-70.
- 109 Moo-Young M, Moreira A. R. and Tengerdy, R.P. (1983). Principles of solid-substrate fermentation. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 4. Ed. Smith J.E., Berry D.R. and Kristiansen B. Edward Arnold. London. pp: 117-144.
- 110 Morton A.G. and MacMillan A. (1954). The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Exp. Bot.* **5**: 232-252.
- 111 Mudgett R.E. (1986). Solid-state fermentations. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. A.L. Demain and H.A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp: 66-83.
- 112 Mudgett R.E., Nash J. and Rufner R. (1982). Controlled gas environments in solid substrate fermentations. *Dev. Ind. Microbiol.* **23**: 397-405.
- 113 Mukherjee K. and Sengupta S. (1985). The production of constitutive invertase and inulinase by mushroom *Panaeolus papillonaceus* in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **37**: 773-777.
- 114 Nagel F.J.J.I., Tramper J., Bakker M.S.N. and Rinzema A. (2001a). Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **72**(2): 219-230.
-

- 
- 115 Nagel F.J.J.I., Tramper J., Bakker M.S.N. and Rinzema A. (2001b). Model for on-line moisture content control during solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **72**(2): 231-243.
- 116 Nakadai T. and Nasuno S. (1988). Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation. *J. Ferment. Tech.* **66**: 525-533.
- 117 Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Atthasampunna P. and Taguchi H. (1984). Control of water content in a solid state cultura of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Tech.* **62**: 453-459.
- 118 Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R. and Taguchi H. (1982). Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Tech.* **60**: 311-319.
- 119 Nelson T.S., Ferrara L.W. and Storer N.L. (1968). Phytase phosphorus content of feed ingredients derived from plants. *Poultry Sci.* **47**: 1372-1374
- 120 Nelson T.S., Shieh T. and Wodzinski R.J. (1971). Effect of supplemental phytase on the utilization of phytase phosphorus by chicks. *J. Nutr.* **101**: 1289-1294.
121. Nielsen J., Villadsen J. and Liden G. (2003). Bioreaction engineering principles. Second Edition. Ed. Kluwer Academic- Plenum Publishers. New York USA. pp: 53-60.
- 122 Nishio N., Tai K. and Nagai S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 263-270.
- 123 Nguyen Q.D., Matter F., Hoschke A., Rezessy-Szabo J. and Bhat M.K. (1999). Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by  $\beta$ - fructofuranoside from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Biotechnol. Lett.* **21**: 183-186.
- 124 Okazaki N. and Sugama S. (1979). A new apparatus for automatic growth estimation of mold cultured on solid media. *J. Ferment. Tech.* **57**: 413-417.
- 125 Ooijkaas L.P., Weber F.J., Buitelaar R.M., Tramper J. and Rinzema A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol.* **18**: 356-360.
- 126 Oostra J., Tramper J. and Rinzema A. (2000). Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enzym. Microb. Tech.* **27**: 652-663.
- 127 Oriol E., Raimbault M., Roussos S. and Viniegra-González G. (1988). Water and water activity in the solid atate fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 498-503.
- 128 Pandey A. (1991). Aspects for design of fermenter in solid-state fermentation. *Process Biochem.* **26**: 355-361.
-

- 
- 129 Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**: 81-84.
- 130 Pandey A., Selvakumar P., Soccol C. and Nigam P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* **77**:149-162.
- 131 Pandey A., Soccol C.R., Rodríguez-León J.A. and Nigam Poonam. (2001). Solid-state fermentation in biotechnology: Fundamentals and applications. Asiatech Publishers. New Delhi.
- 132 Peña y Lillo M., Pérez-Correa R., Agosin E. and Latrille E. (2001). Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **76**(1): 44-51.
- 133 Peñaloza W., Molina M.R., Brenes R.G. and Bressani R. (1985). Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 388-393.
- 134 Pérez-Guerra A., Torrado-Agrassar C., López-Macias and Pastrana L. (2003). Main characteristics and applications of solid state fermentation, *Electron. J. Agr. Food Chem.* **2**: 343–350.
- 135 Pérez J.A., Rodríguez J., Rodríguez L. and Ruiz T. (1996). Cloning and sequence analysis of the invertase gene INV 1 from the yeast *Pichia anomala*. *Curr. Gen.* **29**: 234-240.
- 136 Perry R.H. (1984). Chemical engineers Handbook, 6<sup>th</sup> ed. McGraw Hill, New York.
- 137 Perry R.H., Green D.W. and Maloney J.O. (1999). Perry's chemical engineer's Handbook, 7<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, New York.
- 138 Peterson S.W. (1992). Abstr. 92<sup>nd</sup> Gen. Meeting Am. Soc. Microbiol. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. pp: 198.
- 139 Pitt J.I. (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In *Water relations of food*. Ed. R.B. Duckworth. Academic Press. London. pp: 273-307.
- 140 Pomeranz Y and Shellenberger J.A. (1971). In *Bread Science and Technology*. Ed. Y. Pomeranz and J.A Schellenberger. AVI Publishing Company Inc., Westport. pp: 224-245.
- 141 Pontecorvo G. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**:141-238.
- 142 Prior A.B., DuPreez J.C. and Rein P.W. (1992) Environmental parameters. In: *Solid substrate cultivation*. Ed. Elsevier Applied Science.
- 143 Quiroga E.N., Vattuone M. A. and Sampietro A.R. (1995). Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1251**: 75-80.
- 144 Raboy V. (2003). Myo-Inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisphosphate. *Phytochem.* **64**: 1033–1043.
- 145 Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V. and Karanth N.G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**: 127-135.
-

- 
- 146 Raimbault M. and Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 199-209.
- 147 Raimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Elec. J. Biotechnol.* **1**: 1-15.
- 148 Rajagopalan S. and Modak J.M. (1994). Heat and mass transfer simulation studies for solid-state fermentation processes. *Chem. Eng. Sci.* **49**:2187-2193.
- 149 Rajagopalan S. and Modak J.M. (1995). Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process in tray bioreactor. *Bioproc. Eng.* **13**: 161-169.
- 150 Rathbun B.L. and Shuler M.L. (1983). Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentation: Design of fermentors chambers. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 929-938.
- 151 Reddy N.R., Sathe S.K. and Salunkhe D.K. (1982). Phytase in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **82**: 1-92.
- 152 Reid I. D. (1989). Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzym. Microb. Tech.* **11**: 786-803.
- 153 Robinson T. and Nigam P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**: 197-203.
- 154 Robinson T., Singh D. and Nigam P. (2001). Solid-state fermentation: A promising technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **55**:284-289.
- 155 Rojas S.W. and Scott M.L. (1968). Factors effecting the nutritive value of cottonseed meal as a protein source in chick diets. *Poultry Sci.* **48**: 819-835.
- 156 Romero-Gómez S.J. (2001). Producción de invertasa por *Aspergillus* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- 157 Romero-Gómez S.J., Augur C. and Viniegra-González G. (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1255-1258.
- 158 Roopesh K., Ramachandran S., Nampoothiri K.M., Szakacs G. and Pandey A. (2006). Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Biotechnol. Tech.* **97**(3): 506-511.
- 159 Rubio M.C. and Maldonado M.C. (1995). Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Curr. Microbiol.* **31**: 80-83.
- 160 Samson R.A. (1992). Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. Klich M.A. editors. *Aspergillus: Biología y aplicaciones industriales*. Edit. Butterworth-Heinemann. Cap. 16.
-

- 
- 161 Samson R.A. (1994). Taxonomy-current concepts of *Aspergillus* sytematics. In *Aspergillus*. Vol 1, edit. Smith J.E. Plenum Press. pp: 1-23.
- 162 Sangsurasak P. and Mitchell D.A. (1995). The investigation of transient multidimensional heat transfer in solid state fermentation. *Chem. Eng. J.* **60**: 199-204.
- 163 Sargantanis J., Karim M.N., Murphy V.G., Ryoo D. and Tengerdy R.P. (1993). Effect of operating conditions on solid-substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 149-158.
- 164 Sato K., Nagatani M., Nakamuri K.I. and Sato S. (1983). Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. *J. Ferment. Tech.* **61**: 623-629.
- 165 Sato K., Nagatani M. and Sato S. (1982). A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. *J. Ferment. Tech.* **60**: 667-673.
- 166 Saucedo-Castañeda G., Gutiérrez-Rojas M., Bacquet G., Raimbault M.Y. and Viniegra-González G. (1990). Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 802-808.
- 167 Saucedo-Castañeda G., Lonsane B. K. and Raimbault M. (1992). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid-state fermentation system. *Process Biochem.* **27**: 97-107.
- 168 Scott W.J. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* **7**: 83-127.
- 169 Selvakumar P., Ashakumary L. and Pandey A. (1996). Microbial synthesis of starch saccharifying enzyme in solid culture. *J. Sci. Ind. Res.* **55**: 443-449.
- 170 Shankaranand V.S., Ramsh M.V and Lonsane B.K. (1992). Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem.* **27**: 33-36.
- 171 Shieh T.R. and Ware J.H. (1968). Survery of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* **16**: 1348-1351.
- 172 Shie T.R., Wodzinski R.J. and Ware J.H. (1969). Regulation of the formation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus*. *J. Bacteriol.* **100**: 1161-1165.
- 173 Silman R.W. (1980). Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 411-420.
- 174 Silman R.W., Conway H.F., Anderson R.A. and Bagley E.B. (1979). Production of aflatoxin in corn by a large-scale solid-substrate fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 1799-1808.
- 175 Singh R.P. and Heldman D.R. (1993). Introduction to food engineering. Second Edition. Ed. Academic Press London UK. pp: 139-142.
-



- 
- 176 Smith J.M. (1970). Chemical engineering kinetics. 2<sup>nd</sup> ed., McGraw Hill Book Co.
- 177 Smith J.E. and Aidoo K.E. (1988). Growth of fungi on solid substrate. In *Physiology of Industrial Fungi*, ed. D.R. Berry. Blackwell Scientific Publ., Oxford. pp: 249-269.
- 178 Smith J.E and Pateman J.A. (1997). Genética y fisiología de *Aspergillus*. Academic Press. pp: 1-80.
- 179 Smits J.P., Rinzema A., Tramper J., Van Sonsbeek H.M. and Knol W. (1996). Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance enzyme production, growth and kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 489-496.
- 180 Smits J. P., Rinzema A., Tramper J., Sonsbeek H.M.M, Hage J.C., Kaynak A. and Knol W. (1998). The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzym. Microbial. Tech.* **22**: 50-57.
- 181 Smits J.P., van Sonsbeek J., Tramper J., Knol W., Geelhoed M., Peeters M. and Rinzema A. (1999). Modeling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. *Bioproc. Eng.* **20**: 391-404.
- 182 Sugama S. and Okazaki N. (1979). Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. *J. Ferment. Tech.* **57**: 408-412.
- 183 Sweat V.E. (1995). Thermal properties of foods In: *Engineering properties of foods*. Second Edition. Ed. M.A. Rao and S.S.H. Rizvi. Marcel Dekker New York USA. pp: 99-138
- 184 Szewczyk K.W. (1993). The influence of heat and mass transfer on solid state fermentation. *Acta Biochem. Pol.* **40**: 90-92.
- 185 Tengerdy R.P. (1985). Solid substrate fermentation. *Trends Biotechnol.* **3**: 96-99.
- 186 Toledo R.T. (1994). Fundamentals of food process engineering. 2nd Edition. Ed. Chapman & Hall New York USA. pp: 233-238.
- 187 Trevelyan W.E. (1974). The enrichment of cassava by moist-solids fermentation. *Trop. Sci.* **16**:179-194.
- 188 Troller J.A. (1980). Influence of water activity on microorganisms in food. *Food Tech.* **34**: 76-82.
- 189 Ullah A.H.J. and Gibson D.M. (1987). Extracellular phytase (E.C.3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.* **17**: 63-91.
- 190 Ullah A.H.J. and Cummins B.J. (1987). Purification, N-terminal amino acids sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Prep. Biochem.* **17**: 397-422.
-

- 
- 191 Ullah A.H.J. and Cummins B.J. (1988). *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum phosphatase: purification, N-terminal amino acid sequence, and biochemical characterization. *Prep. Biochem.* **18**: 37-65.
- 192 Ulmer D.C., Tengerdy R.P. and Murphy V.G. (1981). Solid-state fermentation of steam-treated feedlot waste fiber with *chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 449-461.
- 193 Underkofler L.A., Severson A.M., Goering K.J. and Christensen L.M. (1947). Commercial production and use of mold bran. *Cereal Chem.* **24**: 1-22.
- 194 VanDemark P.J. and Batzing B.L. (1987). The microbes. An introduction to their nature and importance. Benjamin/Cummings, Menlo Park. pp: 162-165.
- 195 Viniegra González G., Favela Torres E., Aguilar C., Romero Gómez S., Díaz Godínez G. and Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* **13**: 157-167.
- 196 Vrije T., Antoine N., Buitelaar R., Bruckner S., Dissevelt M., Durant A., Gerlagh M., Jones E., Lüth P., Oostra J., Ravensberg W., Rebaud R., Rinzema A., Weber F. and Whipps J. (2001). The fungal biocontrol agent coniothyrium minitans: Production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **56**:58-68.
- 197 Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E. and Lilly M.D. (1979). Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Song. New York.
- 198 Wang H.L. and Hesseltine C.W. (1982). Oriental fermented foods. In *Prescott and dunn's industrial microbiology*, 4<sup>th</sup> ed., Ed. G. Reed. AV Publishing Company, Westport, Connecticut. pp: 492-538.
- 199 Weber F.J., Oostra J., Tramper J.Y, Rinzema A. (2002). Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **77**: 281-393.
- 200 Wissler M.D., Tengerdy R.P. and Murphy V.G. (1983). Biomass measurement in solid-state fermentation using <sup>15</sup>N mass spectrometry. *Dev. Ind. Microbiol.* **24**: 527-538.
- 201 Wodzinski R.J. and Ullah A.H.J. (1996). Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 263-302
- 202 Wood B.J.B. (1977) Oriental food uses of *Aspergillus*. In *Genetics and physiology of Aspergillus*. Ed. J.E. Smith and J.A. Pateman. Academic Press. London. pp: 481-489.
- 203 Xu F.J., Chen H.Z. and Li Z.H. (2002). Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzym. Microb. Tech.* **30**: 45-48.
-

- 204 Zadrazil F. and Brunnert H. (1981). Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 183-188.

**ANEXO**

IMPROVEMENT OF HEAT REMOVAL IN SOLID-STATE FERMENTATION TRAY  
BIORREACTOR BY FORCED AIR CONVECTION

Arturo Figueroa-Montero<sup>a</sup>, Tristán Esparza-Isunza<sup>b</sup>, Gerardo Saucedo-Castañeda<sup>a</sup>, Sergio Huerta-Ochoa<sup>a</sup>, Mariano Gutiérrez-Rojas<sup>a</sup> and Ernesto Favela-Torres<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México D.F., México.*

<sup>b</sup> *Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México D.F., México.*

# Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection

Arturo Figueroa-Montero,<sup>a</sup> Tristán Esparza-Isunza,<sup>b</sup>  
Gerardo Saucedo-Castañeda,<sup>a</sup> Sergio Huerta-Ochoa,<sup>a</sup>  
Mariano Gutiérrez-Rojas<sup>a</sup> and Ernesto Favela-Torres<sup>a\*</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** Heat removal is one of the major constraints in large-scale solid-state fermentation (SSF) processes. The effect of internal air circulation by forced convection on heat and water transfer has not been studied in SSF tray bioreactors. Formulation of a mathematical model for SSF requires a good estimation of the mass and heat transfer coefficients.

**RESULTS:** A stainless steel tray bioreactor (80.6 L capacity) was used. *Aspergillus niger* C28B25 was cultivated under SSF conditions on an inert support. Temperature, moisture content, biomass and substrate concentrations were measured. Water and energy integral balances were used to estimate the heat and mass transfer coefficients involved in the process. The Reynolds number ( $N_{Re}$ ) in the headspace of the tray bioreactor ranged from 2.5 to 2839, which increased the global heat transfer coefficient from 4.2 to 6.9 ( $W m^{-2} K^{-1}$ ) and the mass transfer coefficient from 1.0 to 2.1 ( $g m^{-2} s^{-1}$ ). Mathematical model predictions of the temperature and moisture content of the fermentation bed showed a high goodness-of-fit with the experimental results.

**CONCLUSIONS:** This is the first report describing the effect of  $N_{Re}$  of air in the headspace of a SSF tray bioreactor on the heat and mass transfer coefficients and temperature regulation in SSF.

© 2011 Society of Chemical Industry

**Keywords:** solid-state fermentation (SSF); tray bioreactor; forced air circulation; heat and mass transfer; *Aspergillus niger*

## INTRODUCTION

Solid-state fermentation (SSF) is defined as the growth of microorganisms in moist, non-soluble substrates with low water content.<sup>1</sup> SSF is employed in the production of enzymes,<sup>2</sup> bio-pesticides,<sup>3</sup> edible products and a wide variety of secondary metabolites.<sup>4,5</sup> Metabolic heat generation, low water content, as well as the low thermal conductivity of the substrates used in SSF, lead to a rise in temperature on the fermentation bed affecting the overall microbial metabolism.<sup>6</sup> Because of these issues, the scale-up of SSF processes from the laboratory to industrial level requires detailed studies of energy and water balances to determine appropriate scaling up criteria.<sup>7</sup>

SSF bioreactors involve two operating modes: static (tray and packed bed or column) and agitated (horizontal, vertical and rotational drum). Heat and mass transfer ( $CO_2$ ,  $O_2$  and water) in packed bed and agitated bioreactors has been widely studied.<sup>8</sup> However, although tray bioreactors have been employed for a long time and are considered the simplest SSF bioreactor,<sup>5,9,10</sup> few studies related to heat and mass transfer in tray bioreactors have been published.<sup>11–15</sup>

Although the fermentation bed in a tray bioreactor is a packed bed, the major difference between a packed bed and a tray bioreactor is that in the former, aeration is through the packed bed while in the latter; aeration is over and under the bed. This

difference makes the analysis of heat and mass transfer for tray bioreactors more difficult than for packed bed bioreactors. Few strategies have been designed for the removal of heat during fermentation in beds of this type of bioreactor. Application of cooling surfaces in this type of bioreactor was studied,<sup>15</sup> and a mathematical model was developed for the study of mass and energy transfer. The use of cooling surfaces requires the construction of a new bioreactor for the SSF process. The effect of dynamic changes of the air on heat transfer has already been studied;<sup>16–18</sup> however, water or energy balances were not developed. Up until now, the effect of  $N_{Re}$  (Reynolds number), as a function of the internal airflow in the headspace of tray bioreactors, on heat removal and mass transfer has not received sufficient attention.<sup>8</sup>

\* Correspondence to: Ernesto Favela-Torres, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, A.P. 55-535, Mexico D.F., C.P. 09340, Mexico. E-mail: favela@xanum.uam.mx

a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, A.P. 55-535, Mexico D.F., C.P. 09340, Mexico

b Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, Mexico D.F., Mexico

**Table 1.** Operation conditions of SSF

Experimental condition (EC)	1	2	3
Fans	No	No	Yes
$G$ (cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	1000	1900	1900
$N_{Re}^a$	1.33	2.53	2839
$z_b$ (cm)	1.5	2.5	2.5
$v$ (cm s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	–	–	50
VKgM	1.41	1.61	1.61
$W_b$ (g · g <sub>IS</sub> <sup>-1</sup> )	1.24	1.24	1.22
pH	5.96	5.57	5.80
Aw	0.976	0.977	0.977

<sup>a</sup> In EC 1 and 2,  $N_{Re}$  was expressed as  $N_{Re} = L \cdot G \cdot \rho_{air} \cdot (A_T \cdot \mu_{air})^{-1}$ , in EC 3  $N_{Re}$  was expressed as  $N_{Re} = L \cdot v \cdot \rho_{air} \cdot \mu_{air}^{-1}$ .

<sup>b</sup> In EC 1 and 2  $v$  is too low to be measured.

One of the major challenges continues to be estimation of the heat and mass transfer coefficients from the fermentation bed to the air in the headspace of the bioreactor. These transfer coefficients are required in mathematical models. In some works, heat transfer coefficients are taken from those developed for air-drying operations, but these have many differences with the SSF process.<sup>15</sup> To our knowledge, studies dealing with the estimation of heat and mass transfer coefficients in SSF tray bioreactors are not available in scientific reports. The use of an inert support and a defined medium allow the measurement of substrate consumption and biomass production.<sup>19</sup> Inert supports have therefore been used as model systems in order to develop mathematical models.<sup>20,21</sup>

The aim of this work was to develop integral balances of both water and energy to study the effect of operating variables, fermentation bed height and internal air circulation under natural and forced convection conditions, on the temperature and water content of the fermentation bed. Heat and mass (water) transfer coefficients were estimated during fermentation.

## MATERIALS AND METHODS

### Fermentation

#### Microorganism and inoculum propagation

*Aspergillus niger* C28B25 was propagated on agar potato dextrose (40 mL) in 125 mL Erlenmeyer flasks for 5 days at 30 °C. Spores were harvested with 50 mL of 0.1% Tween 80 solution. An inoculum size of  $1 \times 10^7$  spores per gram of dry inert support was used for all experimental conditions (Table 1).

#### Fermentation conditions

SSF studies were carried out with expanded perlite as an inert support impregnated with Pontecorvo medium.<sup>22</sup> The constituents of the medium were supplemented so as to have a final sucrose concentration of 200 mg per gram of dry inert support (145 g L<sup>-1</sup>). The initial moisture content and pH for each run in this work are shown in Table 1. Impregnated and inoculated perlite was packed in aluminum trays to have an apparent density of 420 kg m<sup>-3</sup>. The operating conditions of different SSF experiments are described in Table 1. In runs 1 and 2 the bed height of the fermenting mass on trays was increased from 1.5 to 2.5 cm, and the air flow was increased as a consequence. In comparison, in runs 2 and 3 the bed height was kept constant at 2.5 cm while forced air convection was achieved by fans only in run 3.

### Experimental set-up

A stainless steel tray bioreactor (36.0 cm × 60.8 cm × 48.5 cm) was used (Fig. 1). The bioreactor operation allowed the on-line monitoring of temperature, humidity and CO<sub>2</sub> concentration of the outlet air. The bioreactor was placed in a room with a controlled temperature (30 °C). Input air was previously saturated (100% relative humidity) with water at 30 °C. Air flow (VKgM) was controlled via a rotameter (GLIMONT<sup>®</sup> No.40490). Aluminum fermentation trays (ALCAN<sup>®</sup>) of two different sizes were used. Twelve small trays (7 × 5 × 2.5 cm) were used for sampling during cultures. Four larger trays (18.7 × 12.3 × 2.7 cm) were used for the on-line temperature measurement in the fermentation beds. Internal air circulation by convection was achieved with two fans (Sensflow<sup>®</sup> DC Brushless, Model WFC1212B). Heat transfer coefficients were estimated using the four values of temperature measured on-line during fermentation.

### On-line measurements

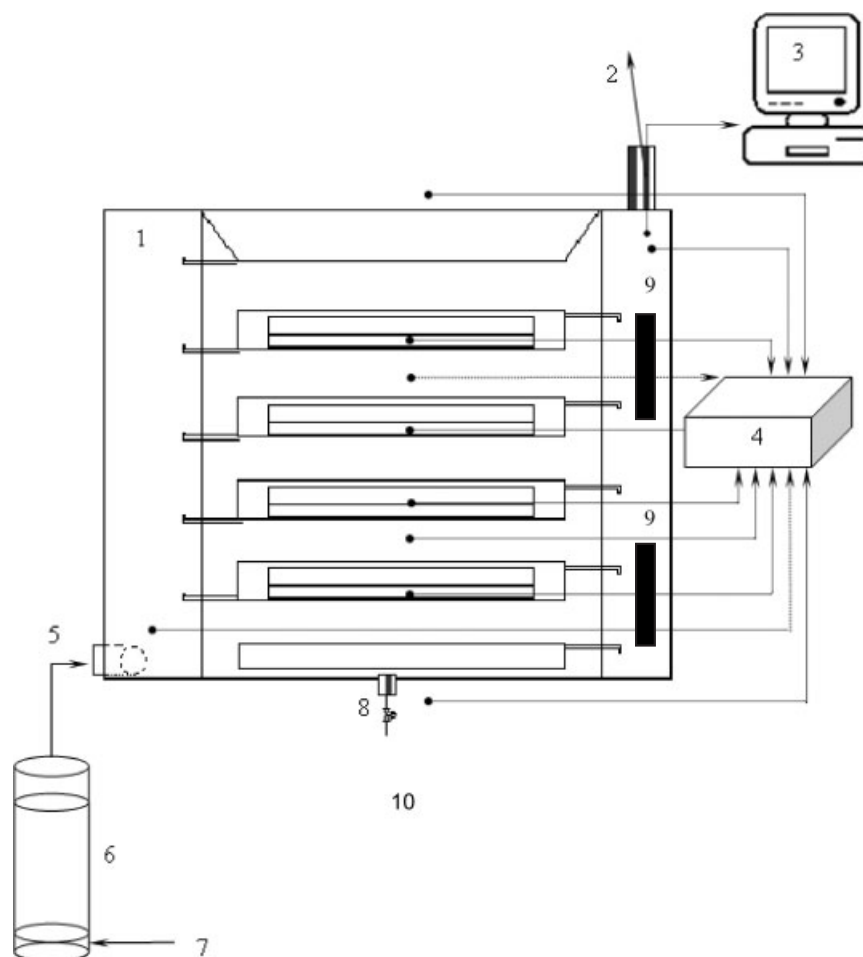
Temperature and CO<sub>2</sub> concentration were measured continuously on-line. Effluent gas was analyzed for CO<sub>2</sub> concentration with an infrared absorption spectrophotometer (Servomex<sup>®</sup> 1505); analysis being made continuously. CO<sub>2</sub> concentration data were captured and stored in computer for further analysis. Reported CO<sub>2</sub> values correspond to the experimental average obtained in the reactor containing the fermentation trays, the rate of aeration (VKgM) was maintained constant as indicated in Table 1. Temperature was measured at different points in the bioreactor (headspace, inlet, outlet and bioreactor surroundings) and in the fermentation beds (bottom) with stainless steel thermocouple penetration probes (type K). Thermocouples were connected to a 12-channel digital thermometer (Cole-Parmer Instrument Company) with a precision of 0.1 °C. The temperature data were stored in the digital thermometer and then transferred to a computer for further analysis. The coefficient of variation ( $100 \times [\text{std deviation}/\text{mean}]$ ) observed in the four temperature measurements in the reactor trays was lower than 3.76%.

### Off-line measurements

Off-line measurements were carried out on samples from the fermented material placed in the small trays after careful mixing. Moisture content was gravimetrically determined with a thermobalance (Moisture Determination Balance, OHAUS Model MB35). Biomass concentration was indirectly measured by analyzing protein content with the colorimetric kit Biorad<sup>®</sup> DC Protein assay. To 0.2 g of dried fermented sample 5 mL of NaOH 0.5 N was added; the suspension obtained was placed in a boiling water bath for 10 min, then the sample was cooled with water at room temperature and filtered (Whatman<sup>®</sup> 41). A 200 μL aliquot of the filtrate was analyzed with the micro assay procedure as proposed by the provider. The calibration curve was obtained with a dry biomass of *Aspergillus niger* C28B25. Substrate (sucrose, glucose and fructose) concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis (Perkin Elmer<sup>®</sup>) with a Phenomenex<sup>®</sup> column, (Resex Organic Acid) at 35 °C using 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as mobile phase. Sugars were analyzed by refraction index.

## MATHEMATICAL MODEL AND SIMULATION

The predominating mechanisms for heat removal were considered. The energy and water balances were associated with a



**Figure 1.** Schematic diagram of fermentation monitoring in the tray bioreactor. 1: bioreactor, 2: air exit, 3: determination and registering of CO<sub>2</sub>, 4: determination and registering of temperature (digital thermometer), 5: saturated air entry, 6: column for saturation of air, 7: dry air inlet, 8: purge, 9: fans, 10: temperature controlled room.

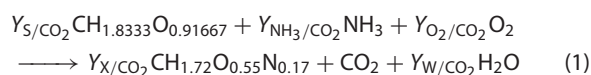
stoichiometric reaction proposed for the growth of *A. niger* on perlite. These balances allow the estimation of heat and mass (water) transfer coefficients during the fungal growth. The use of inert support such as perlite and a defined medium allows the measurement of such variables as substrate consumption and biomass production.

In order to develop the model, water and energy balances were proposed, and growth of *A. niger* was expressed as a stoichiometric balance. Figure 2 shows the relationship between the balances and the way these are used to estimate global heat transfer and mass transfer coefficients. On-line measurement of CO<sub>2</sub> was used to estimate metabolic water generation, biomass production and metabolic heat generation. Biomass concentration was used to estimate the water content of the biomass. Table 2 presents all parameters and variables involved in the model. The main assumptions considered in the mathematical model balances are: (i) a stoichiometry of bioreaction is defined for fermentation; (ii) temperature and humidity gradients in the fermentation system are considered; (iii) evaporation occurs from the surface of the fermentation beds; (iv) physical properties (except for the latent heat of evaporation) are independent of temperature and remain constant throughout fermentation; (v) inlet and outlet air are water saturated (this was confirmed through measurements in the fermentations); (vi) the yield coefficients for the bioreaction

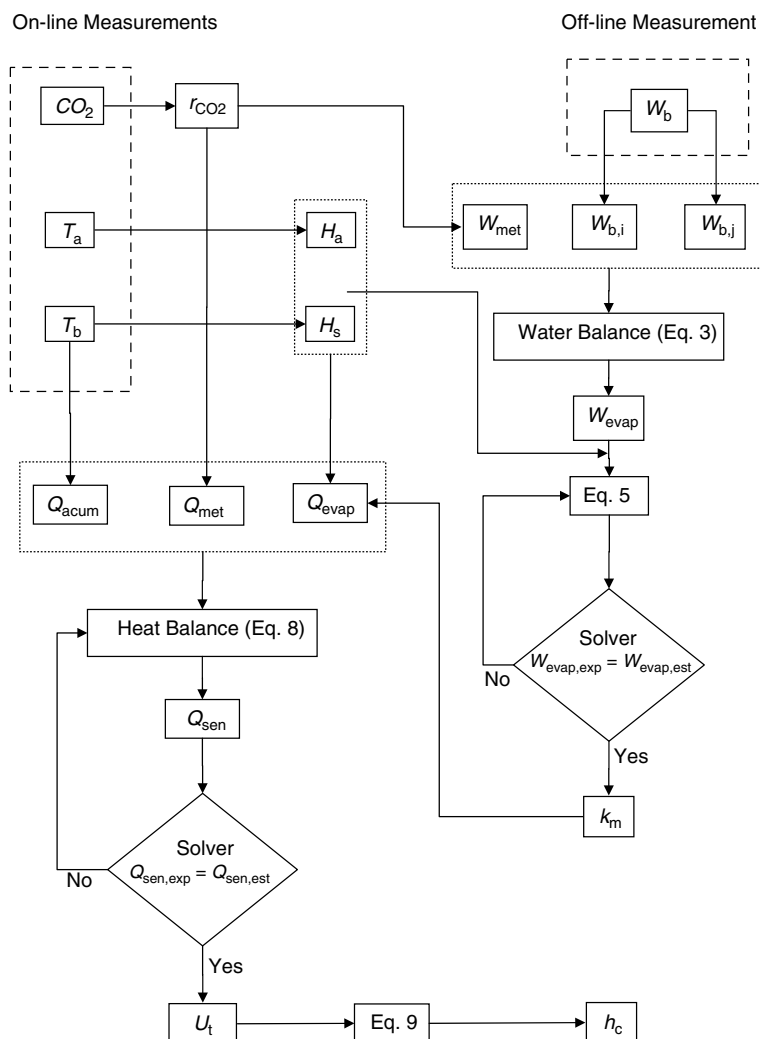
remain constant during the culture; and (vii) the model is only valid when the fermentation bed temperature ( $T_b$ ) is higher than temperature of the flowing air ( $T_a$ ).

### Stoichiometric balance

As discussed in SSF related works,<sup>14,15,20</sup> fermentation yield coefficients can be obtained from specific stoichiometric models by elemental balances. The bioreaction presented in Equation (1) was used to estimate the stoichiometric coefficients for the growth of *A. niger* under SSF conditions in the tray bioreactor. Yield coefficients are expressed in C-mol base, such that:



The average elemental composition of biomass of *A. niger* was assumed as CH<sub>1.72</sub>O<sub>0.55</sub>N<sub>0.17</sub>.<sup>23</sup> An underestimated algebraic system is obtained by applying elemental balances in Equation (1), since there are five unknown yields but only four elements. In order to have a well defined algebraic system one yield coefficient must be measured independently. The use of an inert support and a defined culture medium allowed the accurate estimation of the biomass/sucrose yield ( $Y_{X/S}$ ).



**Figure 2.** Schematic diagram of the balances used for the estimation of global heat transfer coefficient ( $U_t$ ) and mass transfer coefficient ( $k_m$ ).

The  $CO_2$  production rate was modeled using the logistic equation:

$$r_{CO_2} = \mu_{CO_2} \cdot CO_2 \left( 1 - \frac{CO_2}{CO_{2,max}} \right) \quad (2)$$

**Water balance**

The SSF in tray bioreactors is a batch process under non-steady-state; the final water content is the result of the initial water content plus water produced by metabolism minus evaporated water. The basic equation of the water integral balance in the solid bed, for any time between sampling, can be written as follows:

$$W_{evap,ij} = W_{b,i} - W_{b,j} + W_{met,ij} \quad (3)$$

where  $W_{b,i}$  and  $W_{b,j}$  are the water content of the fermentation bed expressed as grams of water per gram of dry inert support, and correspond to the initial and final water content in the solid bed,  $W_{evap,ij}$  and  $W_{met,ij}$  are the mass of evaporated and metabolic water generation respectively, per gram of inert support in any time interval.  $W_{met,ij}$  is calculated by the following equation:

$$W_{met,ij} = MW_W \cdot Y_{W/CO_2} \cdot \int_i^j r_{CO_2} \quad (4)$$

where  $MW_W$  is the molecular weight of water,  $Y_{W/CO_2}$  is the yield coefficient of metabolic water generation and  $r_{CO_2}$  is the  $CO_2$  production rate, expressed as mol per hour per gram ( $mol\ h^{-1}\ g^{-1}$ ) of perlite.

Considering that the evaporation of water from the fermentation bed is a drying process and the moisture content of the fermentation bed is greater than its critical moisture content, then water evaporation can be described as<sup>24</sup>

$$W_{evap,ij} = k_m A_c \int_i^j (H_s - H_a) dt \quad (5)$$

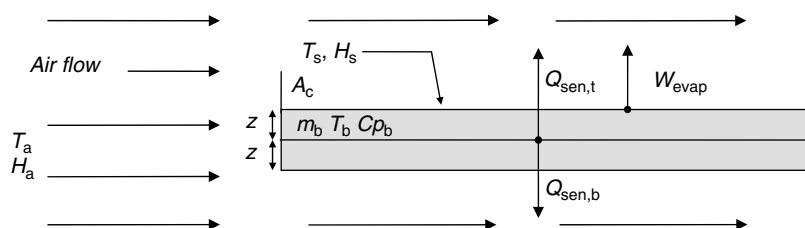
where  $k_m$  is the convective mass transfer coefficient for water,  $A_c$  is the specific mass transfer area,  $H_a$  and  $H_s$  are the humidity ratios of air flowing in the inlet and of air on the fermentation bed surface, respectively. These values were calculated with temperature measurements using a psychrometric chart, assuming that the temperature at the surface is equal to the temperature at the centre of the fermentation bed.

Equation (5) and  $W_{evap}$  (Equation (3)) for each interval sampling time allows the numerical estimation (“Solver” function of



**Table 2.** Notation, units and values of the parameters used in the balances and model

Symbol	Description	Value & units	Source or Reference
$A_c$	Heat transfer specific area	$m^2$	Operation variable
$A_T$	Total transverse area to air flow	$710 \text{ cm}^2$	Operation variable
$CO_2$	Produced $CO_2$	$\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Operation variable
$CO_{2\text{max}}$	Maximum produced $CO_2$	$\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Operation variable
$C_{p_b}$	Specific heat of fermentation bed	$2.568 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Calculated
$G$	Volumetric air flow	$\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$	Operation variable
$H_a$	Humidity ratio of flowing air	$\text{g} \text{ g}^{-1} \text{ dry air}$	Estimated using $T_a$
$H_{a,0}$	Initial humidity ratio of flowing air of model	$\text{g} \text{ g}^{-1} \text{ dry air}$	Estimated using $T_a$
$h_c$	Heat transfer coefficient of the tray	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$	Estimated by energy balance
$H_s$	Humidity ratio in fermentation bed surface	$\text{g} \text{ g}^{-1} \text{ dry air}$	Estimated using $T_b$
$H_{s,0}$	Initial humidity ratio in SSF bed of model	$\text{g} \text{ g}^{-1} \text{ dry air}$	Estimated using $T_b$
$k_b$	Conductivity of fermentation bed	$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Calculated
$k_m$	Mass transfer coefficient	$\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Estimated by water balance
$L$	Length of tray parallel to air flow	$12.3 \text{ m}$	Operation variable
$m_b$	Inert support mass	$\text{g}_{\text{IS}}$	Operation variable
$MW_W$	Molecular weight of water	$18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Known
$MW_X$	Molecular weight of biomass	$24.9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Nielsen <i>et al.</i> 2003 <sup>23</sup>
$Q_{\text{acum}}$	Heat accumulation in the bed	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Measured
$Q_{\text{evap}}$	Heat removed by water evaporation	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Estimated by water balance
$Q_{\text{met}}$	Metabolic heat generation	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Calculated by produced $CO_2$
$Q_{\text{sen,b}}$	Sensible heat transfer on tray bottom	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Estimated by energy balance
$Q_{\text{sen,est}}$	Sensible heat transfer on tray, estimated	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Estimated by model
$Q_{\text{sen,exp}}$	Sensible heat transfer on tray, experimental	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Calculated by balance
$Q_{\text{sen,t}}$	Sensible Heat transfer on tray top	$\text{J} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Estimated by energy balance
$r_{CO_2}$	$CO_2$ rate production	$\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Measured variable
$T_a$	Temperature of air flowing	$^{\circ}\text{C}$	Operation variable
$T_{a,0}$	Initial temperature of air flowing of model	$30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	Model parameter
$T_b$	Fermentation bed temperature	$^{\circ}\text{C}$	Operation variable
$T_{b,0}$	Initial fermentation bed temperature of model	$30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	Model parameter
$T_{\text{out}}$	Temperature outlet air of bioreactor	$^{\circ}\text{C}$	Operation variable
$T_s$	Fermentation bed surface temperature	$^{\circ}\text{C}$	Operation variable
$U_b$	Global heat transfer coefficient of SSF bed	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$	Neglected by energy balance
$U_t$	Global heat transfer coefficient of tray	$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$	Estimated by energy balance
$V$	Velocity of air parallel to tray	$\text{cm} \text{ s}^{-1}$	Operation variable
$W_{b,i}$	Initial moisture content in the bed	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Measured
$W_{b,j}$	Final moisture content in the bed	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Measured
$W_{\text{evap,est}}$	Evaporated water, estimated	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Estimated by model
$W_{\text{evap,exp}}$	Evaporated water, experimental	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Calculated by water balance
$W_{\text{evap,i,j}}$	Evaporated water	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Estimated by water balance
$W_{\text{met,i,j}}$	Metabolic water	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{IS}}^{-1}$	Calculated by produced $CO_2$
$x_{\text{IS}}$	Mass fraction of inert support	$0.4025$	Measured
$Y_{\text{NH}_3/\text{CO}_2}$	Yield coefficient for ammonia ( $\text{NH}_3$ ) - $CO_2$	$\text{mol} \text{ NH}_3 \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Calculated by stoichiometry
$Y_{\text{O}_2/\text{CO}_2}$	Yield coefficient for oxygen ( $\text{O}_2$ ) - $CO_2$	$\text{mol} \text{ O}_2 \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Calculated by stoichiometry
$Y_{\text{S}/\text{CO}_2}$	Yield coefficient for substrate (S) - $CO_2$	$\text{Cmol} \text{ S} \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Assumed
$Y_{\text{X}/\text{CO}_2}$	Yield coefficient for biomass (X) - $CO_2$	$\text{Cmol} \text{ X} \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Assumed
$Y_{\text{X}/\text{S}}$	Yield coefficient for biomass (X) - substrate (S)	$\text{Cmol} \text{ X} \cdot \text{mol} \text{ S}^{-1}$	Measured
$Y_{\text{W}/\text{CO}_2}$	Yield coefficient for Water (W) - $CO_2$	$\text{mol} \text{ W} \cdot \text{mol} \text{ CO}_2^{-1}$	Calculated by stoichiometry
$z_b$	Fermentation bed height	$\text{m}$	Operation variable
$\alpha$	Produced heat per mole of $CO_2$ generated	$460 \times 10^3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$	Nielsen <i>et al.</i> , 2003 <sup>23</sup>
$\lambda_w$	Latent heat of water vaporization	$\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$	Himmelblau, 1996 <sup>25</sup>
$\mu_{\text{air}}$	Air viscosity in bioreactor headspace	$1.863 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Perry <i>et al.</i> , 1999 <sup>26</sup>
$\mu_{\text{CO}_2}$	Specific $CO_2$ production rate	$\text{h}^{-1}$	Calculated
$\rho_{\text{air}}$	Air density in bioreactor headspace	$0.00086 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$	Perry <i>et al.</i> , 1999 <sup>26</sup>



**Figure 3.** Schematic diagram of heat transfer mechanisms in a single tray.

Microsoft Excel<sup>®</sup>) of the mass transfer coefficient ( $k_m$ ), from the surface of the fermentation bed to the headspace of the bioreactor.

Changes in the water content of the fermentation bed ( $W_b$ ) depend on the generation of metabolic water and on the water evaporation rate as follows:

$$\frac{dW_b}{dt} = MW_W \cdot Y_{W/CO_2} \cdot r_{CO_2} - k_m A_c (H_s - H_{a,0}) \quad (6)$$

### Energy balance

Heat transfer from each tray to the surrounding air flow follows at least three mechanisms (Fig. 3): (i) evaporation of water from the surface of the fermentation bed; (ii) sensible heat transfer by conduction and convection from the top of the fermentation bed; and (iii) sensible heat transfer by conduction and convection from the bottom of the tray. The overall energy balance for any interval of time can be written as follows:

$$Q_{acum} = -Q_{sen,t} - Q_{sen,b} - Q_{evap} + Q_{met} \quad (7)$$

The elements of above equation are detailed in Fig. 3, where  $Q_{acum}$  is the positive (or negative) heat accumulation caused by the increase (or decrease) of the fermentation bed temperature,  $T_b$ .  $Q_{sen,t}$  and  $Q_{sen,b}$  are the heat removed through the top and bottom of the fermentation bed and depend on the global heat transfer coefficients ( $U_t$  and  $U_b$ , respectively), temperature differences in the system ( $T_b - T_a$ ) and the heat transfer area ( $A_c$ ).  $Q_{evap}$  is the heat removed by water evaporation from the fermentation bed surface.  $Q_{met}$  is the metabolic heat generation that can be related to the  $CO_2$  production rate. Using these definitions in Equation (7), the energy balance can be expressed as

$$\frac{c_{p,b}}{x_{I5}} \frac{dT_b}{dt} = -U_t A_c (T_b - T_a) - U_b A_c (T_b - T_a) - \lambda_w k_m A_c (H_s - H_a) + \frac{\alpha}{m_b} r_{CO_2} \quad (8)$$

Assuming that the thermal resistance of the aluminum in the trays is negligible due to its high conductivity,  $U_t$  and  $U_b$  are equal and defined as

$$U_b = U_t = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b}} \quad (9)$$

This assumption allows grouping the two elements of  $Q_{sen}$  into just one.

Integration of Equation (8) for each time interval between sampling allows the numerical estimation ('Solver' function of Microsoft Excel) of the global heat transfer coefficient of the tray to the headspace of bioreactor,  $U_t$ .

The fermentation bed temperature ( $T_b$ ) was simulated as follows:

$$\frac{dT_b}{dt} = \frac{1}{c_{p,b}/x_{I5}} \left[ -2U_t A_c (T_{b,0} - T_{a,0}) - \lambda_w k_m A_c (H_{s,0} - H_{a,0}) + \frac{\alpha}{m_b} r_{CO_2} \right] \quad (10)$$

$T_{b,0}$  and  $T_{a,0}$  are the initial values (both 30 °C) of the fermentation bed and the input air temperatures, respectively, used in this model.  $H_{s,0}$  and  $H_{a,0}$  are the initial values of humidity ratio for the fermentation bed surface and flowing air, respectively.

From the water and energy balances, ordinary differential equations allow simulation of the temperature and moisture content in the fermentation bed of the tray bioreactor. The system of differential ordinary equations was solved using the algorithm 'Runge-Kutta-Fehlberg' (RKF56) of Polymath<sup>®</sup> Software Version 6.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

The operating conditions of different SSF experiments are described in Table 1. In runs 1 and 2 the bed height of the fermenting mass on the trays was increased from 1.5 to 2.5 cm and the air flow consequently increased. In comparison, in runs 2 and 3 the bed height was kept constant at 2.5 cm while forced air convection was achieved by fans alone in run 3.

In this work, the growth yield coefficients and the heat and water transfer coefficients were obtained experimentally. Then, the effect of operation variables, such as fermentation bed height and forced internal air circulation, on the heat transfer from the fermentation bed to the air in the headspace was evaluated. Finally, by comparing predicted and experimental values, the model developed was validated.

### Estimation of yield coefficients

Kinetic data of biomass production and substrate consumption for each run (Table 1) were used to obtain  $Y_{X/S}$ . This value and the bioreaction equation (Equation (1)) allowed estimation of the following yield coefficients:  $Y_{S/CO_2}$ ,  $Y_{NH_3/CO_2}$ ,  $Y_{O_2/CO_2}$ ,  $Y_{X/CO_2}$  and  $Y_{W/CO_2}$  (Table 3). The yield coefficients  $Y_{S/CO_2}$  and  $Y_{X/CO_2}$  were also obtained experimentally. In runs 1, 2 and 3 the values of  $Y_{S/CO_2}$  measured were 1.55, 1.72 and 1.84  $CmolS molCO_2^{-1}$ , respectively and measured  $Y_{X/CO_2}$  were 0.75, 0.54 and 0.76  $CmolX molCO_2^{-1}$ , respectively. No significant differences between the experimental and estimated yields were observed (Table 3). This fact supports the assumed stoichiometric balance proposed for the model.

### Estimation of mass transfer coefficients

Moisture content measurements ( $W_{b,i}$ ,  $W_{b,j}$ ) and metabolic water production ( $W_{met,ij}$ ) were used to calculate evaporated water at

**Table 3.** Estimated yield coefficients obtained from the stoichiometric balances (Equation (1))

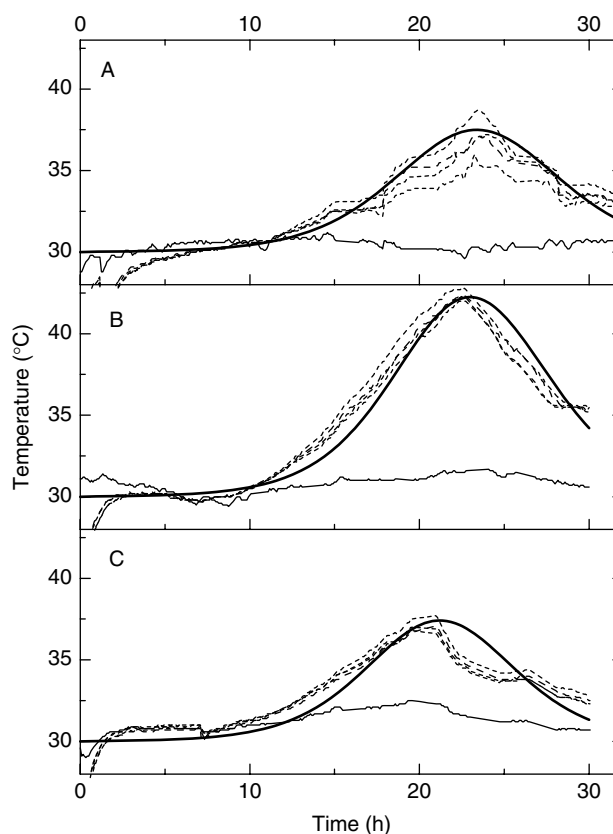
	Experimental conditions		
	1	2	3
$Y_{X/S}$ (CmolX cmolS <sup>-1</sup> )	0.40	0.34	0.46
$Y_{S/CO_2}$ (CmolS molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	1.67	1.52	1.83
$Y_{O_2/CO_2}$ (molO <sub>2</sub> molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	0.98	0.99	0.98
$Y_{X/CO_2}$ (CmolX molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	0.67	0.52	0.83
$Y_{W/CO_2}$ (molW molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	1.13	1.08	1.18
$Y_{NH_3/CO_2}$ (molNH <sub>3</sub> molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	0.11	0.09	0.14
RC (molCO <sub>2</sub> molO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )	1.02	1.01	1.02

**Table 4.** Water balances and estimated mass transfer coefficients

Time interval (h)	$W_{met,i,j}$	Water loss (g g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	$W_{evap,i,j}$	$k_m$ (g m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Experimental condition 1</b>				
0.0–8.67	0.001	0.099	0.100	Na
8.67–15.08	0.004	0.052	0.056	2.44
15.08–19.58	0.013	0.011	0.024	0.18
19.58–25.67	0.044	0.064	0.108	0.84
25.67–31.83	0.035	0.082	0.117	1.40
<b>Experimental condition 2</b>				
0.0–5.0	0.000	0.045	0.045	Na
5.0–10.17	0.001	0.02	0.021	Na
10.17–13.08	0.002	0.006	0.008	0.66
13.08–18.67	0.014	0.034	0.048	0.81
18.67–22.75	0.026	0.065	0.091	0.85
22.75–25.75	0.019	0.063	0.082	1.25
25.75–30.0	0.016	0.07	0.086	1.62
<b>Experimental condition 3</b>				
0.0–7.08	0.001	0.057	0.058	Na
7.08–11.25	0.002	0.025	0.027	Na
11.25–15.50	0.009	0.02	0.029	1.15
15.50–19.58	0.024	0.054	0.078	1.51
19.58–23.00	0.026	0.063	0.089	1.88
23.00–26.50	0.017	0.054	0.071	2.58
26.50–30.08	0.013	0.059	0.072	3.62
Na: $T_a > T_b$ , therefore the model cannot be applied.				

each interval of time defined by the fermentation bed sampling. As shown in Fig. 2,  $Y_{W/CO_2}$  was used to determine metabolic water production as a function of CO<sub>2</sub> production. The average humidity ratios, estimated in the fermentation beds and in the air in the headspace inside the bioreactor and the mass of evaporated water (Equations (3) and (5)), were used to estimate numerically the mass transfer coefficient ( $k_m$ ). In other words the water balance and measured temperatures in the fermentation bed at the four trays were used to estimate  $k_m$ . When the right side is equal the left side of Equation (5), the solver can find the value of the mass transfer coefficient (Fig. 2).

Table 4 shows the values of the water balances for the experimental conditions studied and the estimated mass transfer coefficient ( $k_m$ ) for each time interval. In the time intervals where the fermentation bed temperature ( $T_b$ ) was lower than

**Figure 4.** Fermentation bed temperature (dashed lines), headspace temperature (continuous thin line) and predicted temperature values (continuous thick line). A: Run 1, B: Run 2 and C: Run 3.

the temperature of air ( $T_a$ ),  $k_m$  was not estimated (Fig. 4). Table 6 shows the average mass transfer coefficients ( $k_m$ ) obtained from water balances for the experimental conditions studied.

#### Estimation of heat transfer coefficients

With the value of the mass of evaporated water  $W_{evap}$  and the latent heat of water vaporization, the heat utilized for water evaporation from the fermentation bed ( $Q_{evap}$ ) was calculated. Also from the CO<sub>2</sub> produced the metabolic heat generation ( $Q_{met}$ ) could be calculated and from the temperature profiles and heat capacity of the fermentation bed the heat accumulation in the bed ( $Q_{acum}$ ) could be determined. Using the heat transfer mechanisms in Equation (8) it is possible to calculate the sensible heat ( $Q_{sen}$ ) removed from the fermentation bed.  $Q_{met}$  and differences between temperatures in the fermentation bed and in the headspace inside the bioreactor, along with the energy balance (Equations (7)–(9)), were used to estimate numerically the global ( $U_t$ ) and convective ( $h_c$ ) heat transfer coefficients.

Table 5 shows the values of the heat balances for the experimental conditions studied in this work and the estimated heat transfer coefficients ( $U_t$  and  $h_c$ ) for each time interval. As previously mentioned, there were time intervals where the fermentation bed temperature ( $T_b$ ) was lower than the temperature of flowing air ( $T_a$ ), in such time intervals  $U_t$  and  $h_c$  were not estimated. Table 6 shows the average heat transfer coefficients ( $U_t$ ) obtained from the energy balances of each experiment. Heat transfer coefficients estimated by energy balance presented in this work are similar to those predicted for SSF tray bioreactors.<sup>27</sup>

**Table 5.** Energy balances and estimated heat transfer coefficients

Time interval (h)	$Q_{\text{acum}}$	$Q_{\text{met}}$	$Q_{\text{evap}}$	$Q_{\text{sen}}$	$U_t$	$h_c$
	(J g <sub>is</sub> <sup>-1</sup> )				(W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> )	
<b>Experimental condition 1</b>						
0.0–8.67	38.36	17.53	–244.06	264.88	Na	Na
8.67–15.08	15.15	150.42	–134.68	–0.58	0.005	0.005
15.08–19.58	12.30	370.25	–57.42	–303.53	7.55	9.81
19.58–25.67	1.42	1030.3	–261.54	–767.34	7.05	8.98
25.67–31.83	–8.84	585.83	–282.41	–312.27	3.82	4.42
<b>Experimental condition 2</b>						
0.0–5.0	36.05	0.03	–108.36	144.38	Na	Na
5.0–10.17	2.63	19.88	–52.23	34.98	Na	Na
10.17–13.08	13.34	44.61	–18.24	–13.03	1.40	1.51
13.08–18.67	37.61	325.96	–116.78	–171.57	3.88	4.84
18.67–22.75	20.52	595.24	–217.16	–357.56	5.24	7.14
22.75–25.75	–25.37	445.30	–197.24	–273.42	6.00	8.63
25.75–30.0	–25.60	382.53	–209.66	–198.47	4.55	5.92
<b>Experimental condition 3</b>						
0.0–7.08	52.48	11.01	–141.85	183.34	Na	Na
7.08–11.25	5.26	42.28	–64.47	27.45	Na	Na
11.25–15.50	15.78	185.14	–68.72	–100.63	5.87	8.37
15.50–19.58	16.22	515.53	–189.98	–309.34	7.47	12.02
19.58–23.00	–16.05	559.81	–215.78	–360.07	9.84	19.66
23.00–26.50	1.46	349.73	–169.85	–178.42	6.15	8.93
26.50–30.08	–12.75	266.14	–175.43	–103.46	4.44	7.52

Na:  $T_a > T_b$ , therefore the model cannot be applied.

### Validation of the model

Estimated mass and heat transfer coefficients were used in the mathematical model proposed in this work. Comparison of the experimental results with the values predicted by Equations (6) and (10) validated the model developed. Experimental and predicted data for temperature and moisture content in the fermentation bed are shown in Table 6 and can also be seen in Figs 4 and 5.

Table 6 showed very small prediction errors for the overall values of  $Q_{\text{evap}}$ ,  $Q_{\text{sen}}$ ,  $W_{\text{evap}}$  and water loss. This supports the decision to average the mass and heat transfer coefficients for those time intervals when the only mass and heat transfer was from the fermentation bed to the air in the headspace of the bioreactor.

There was close agreement between the experimental and predicted values of temperature and moisture content of fermentation. Statistical analysis found that for temperatures, the Pearson correlation coefficient has values between 0.879 and 0.967, and for moisture content this correlation coefficient has values between 0.886 and 0.971.

The data presented in Tables 4, 5 and 6 and Figs 4 and 5 validate the proposed model (Equations (6) and (10)). The predictions of the model agree reasonably well with the experimental values; however, there are some visible deviations. Regarding the fermentation bed temperature ( $T_b$ ) (Fig. 4), the predicted values agree with those obtained experimentally. For water content ( $W_b$ ) (Fig. 5), the predictions agree with experimental values, and although agreement is not as good as for the temperature we observe the same trend between model predictions and experimental results. These results can be explained by the nature of the measurements, on-line for temperature and off-line for moisture content.

For run 1 there was good agreement between predicted temperatures and those obtained experimentally. However, for runs 2 and 3 a slight delay (little less than an hour) was observed in the curve obtained by the model (Fig. 5). This deviation could be due to: (i) deviation for the kinetics of production of CO<sub>2</sub> from the logistical equation at the beginning of the fermentation (lag phase); or (ii) deviation of the predicted values caused by drying of solids during the first stages of the fermentation because the temperature of the bed is lower than the temperature of the air in the headspace of the bioreactor. Better results are found when heat transfer occurs from the fermentation bed to the air in the headspace of bioreactor.

### Effect of operation variables

SSF in tray bioreactors has two main operating variables that have an important effect on the performance of this type of bioreactor: (i) the fermentation bed height and (ii) the air supply needed for both the aerobic processes and the meaningful contribution to metabolic heat removal from the fermentation bed.

#### Effect of fermentation bed height

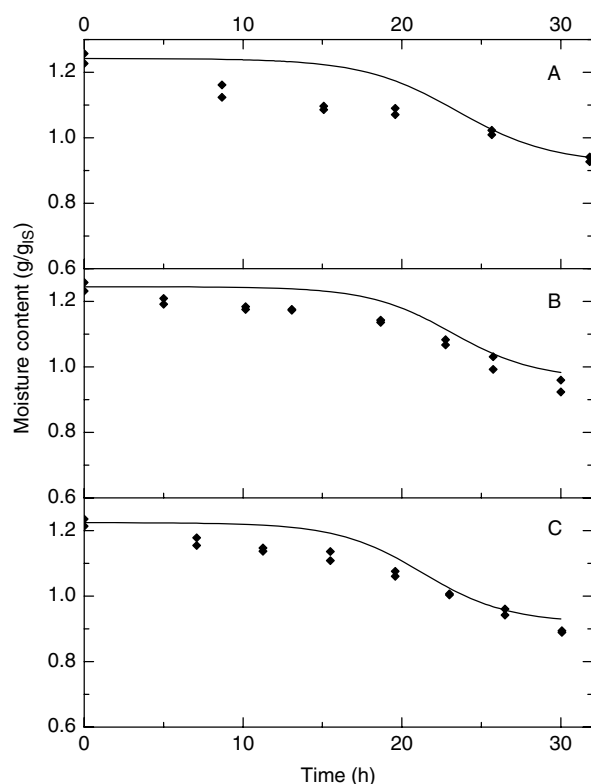
The fermentation bed height and the number of trays are the only two ways of reasonably scaling-up SSF processes in tray bioreactors. The effect of fermentation bed height can be observed when comparing results for runs 1 and 2 (Table 1). Under run 1, a bed height of 1.5 cm was used while under run 2 the bed height was 2.5 cm. In order to supply the same amount of water saturated air per kg of inert support, the airflow was increased from 1000 to 1900 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> for a bed height increase of 1.5 cm to 2.5 cm. The increase in bed height caused a reduction (8.5%) in the global heat

**Table 6.** Heat transfer coefficients and mechanisms of the model

	Experimental condition No.		
	1	2	3
$k_m$ ( $\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$1.22 \pm 0.96^b$	$1.04 \pm 0.39^b$	$2.15 \pm 0.98^b$
$U_t$ ( $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$ )	$4.61 \pm 3.49^c$	$4.22 \pm 1.76^c$	$6.95 \pm 1.78^c$
$h_c$ ( $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$ )	$5.78 \pm 4.54^d$	$5.61 \pm 2.69^d$	$11.3 \pm 4.97^d$
$Q_{\text{met}}$ ( $\text{J g}_{\text{IS}}^{-1}$ )	2154.33	1813.55	1929.65
$Q_{\text{evap}}$ ( $\text{J g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) by measured moistures	-980.11	-919.67	-1026.08
$Q_{\text{evap}}$ ( $\text{J g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) predicted by model	-958.63	-814.61	-924.39
Error in prediction of $Q_{\text{evap}}$ from the bed <sup>a</sup> (%)	-2.19	-11.42	-9.91
$Q_{\text{sen}}$ ( $\text{J g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) calculated by energy balance	-1118.84	-834.69	-841.13
$Q_{\text{sen}}$ ( $\text{J g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) predicted by model	-1181.70	-970.69	-978.53
Error in prediction of $Q_{\text{sen}}$ from the bed <sup>a</sup> (%)	5.62	16.29	16.34
$W_{\text{evap}}$ ( $\text{g g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) calculated by balance	0.405	0.381	0.424
$W_{\text{evap}}$ ( $\text{g g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) predicted by model	0.396	0.339	0.381
Error prediction of $W_{\text{evap}}$ from the bed <sup>a</sup> (%)	-2.22	-11.02	-10.14
Water loss ( $\text{g g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) by measured moistures	0.308	0.238	0.250
Water loss ( $\text{g g}_{\text{IS}}^{-1}$ ) predicted by model	0.302	0.259	0.287
Error in prediction of water loss from the bed (%)	-2.05	8.96	14.77
$W_{\text{met}}$ ( $\text{g g}_{\text{IS}}^{-1}$ )	0.097	0.078	0.092

<sup>a</sup> Error =  $100 \times (\text{predicted} - \text{measured}) / \text{measured}$ .

<sup>b,c,d</sup> Same letter indicates no significant differences ( $\alpha < 0.05$ ).



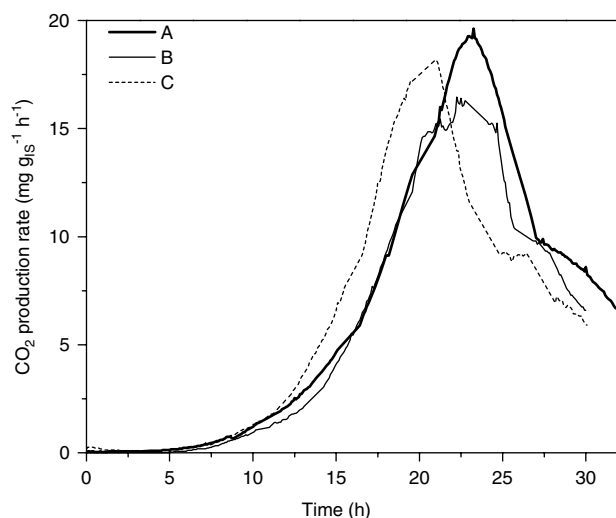
**Figure 5.** Moisture content of the fermentation bed. Experimental data (points) and model predictions (lines). A: Run 1, B: Run 2 and C: Run 3.

transfer coefficient ( $U_t$ ); however, heat transfer coefficients analysis shows no significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) due to the increase in the value of bed height,  $z_b$  (Tables 5 and 6). Although the supply of air was almost doubled, the average convective heat transfer

coefficient ( $h_c$ ) remained practically constant (Table 6) because  $N_{\text{Re}}$  of the headspace increased from 1.33 to 2.53 and remained under laminar conditions, practically under static conditions. The higher fermentation bed height provoked a reduction in  $U_t$  resulting in greater heat accumulation (Fig. 4(A) and 4(B)). The maximum temperatures for bed heights of 1.5 and 2.5 cm were 37 and 42 °C, respectively. There was no significant effect on the final moisture content of the fermentation beds of different heights (Table 4, Fig. 5(A) and 5(B)). However, our results show that evaporation occurs, contributing to metabolic heat removal.

For the case of a rigid inert support such as perlite, used in our work, a term for bed compaction in the mathematical model is not needed. In the case of agro-industrial by-products, the terms related to change of volume, change of void fraction or porosity during the fermentation should be considered, similarly to the traditional chemical engineering studies.<sup>28</sup> Regarding the thickness of the bed, in our conditions we are working below the limit reported as critical in the literature for the mass and heat transfer, where a thickness limit is suggested to be 5 cm for superficially aerated beds in trays<sup>27</sup> and 10 cm for a multi-layer packed bed.<sup>29</sup>

Although the surrounding air was maintained at high humidity ratio (100% saturated) the metabolic water generation was not enough to replace the water evaporated. This contrasts with the model by Smits *et al.*<sup>14</sup> and confirmed in later reviews.<sup>8,27</sup> Kinetics of the  $\text{CO}_2$  production rate (Fig. 6) in run 1 and 2 were similar during the first 21 h of the culture; then the increase in SSF bed height to 2.5 cm had a negative effect on  $\text{CO}_2$  production rate. The overall production of  $\text{CO}_2$  in run 2 was lower (16%) than with a fermentation bed height of 1.5 cm as in run 1.  $Y_{S/\text{CO}_2}$  values were obtained experimentally as detailed earlier, and from the stoichiometric balance (Table 3). Reported values for experimental run 1 and 2 are not significantly different in both approaches; however, both of them (run 1 and 2) are lower than those reported for experimental run 3.



**Figure 6.** CO<sub>2</sub> production rates under different operating conditions. A: Run 1, B: Run 2 and C: Run 3.

#### Effect of internal air circulation by convection

The use of dynamic changes of air (with air pressure pulsation and internal circulation of air) has been previously proposed<sup>16–18</sup> to increase mass and heat transfer, but the coefficients involved in those processes were not evaluated. Water and heat balances were not proposed, and mathematical models for the prediction of temperature and moisture content were not developed in those studies.

According to runs 2 and 3 (Table 1), the increase of air circulation in the bioreactor ( $N_{Re} = 2839$ ) increased the heat transfer coefficients,  $U_t$  and  $h_c$ , 65 and 101%, respectively, compared with those obtained without forced air,  $N_{Re} = 2.5$  (Tables 5 and 6). The increase in these coefficients was due to the reduction of the heat transfer resistance from the fermentation bed to the headspace, improving removal of metabolic heat. The mass transfer coefficient  $k_m$  increased by 106%.

The final moisture content of the fermentation bed was lower in run 3 than in run 2 (Fig. 5(B) and 5(C)), which is caused by the higher rate of evaporation observed in run 3. Even though greater metabolic water generation was observed in run 3 (Tables 4 and 6), it was not enough to replace the evaporated water; in contrast to published reports.<sup>8,14,27</sup> On the other hand, under forced air circulation the CO<sub>2</sub> production rates (runs 2 and 3) were higher than those obtained without forced air circulation (Fig. 6). This was mainly due to the deleterious effect of temperature on the growth of the strain at temperatures above 37 °C and to the improved mass transfer coefficient present in the system.

In the SSF process it is desirable to increase the heat removal from the fermentation bed while maintaining a constant level of water content in the bed. Increasing the air supply of the tray bioreactor facilitates heat removal, but regrettably it causes drying of the bed. The use of fans to favor the internal circulation of air in the headspace of the bioreactor allowed removal of a higher quantity of metabolic heat without the air supply that caused drying. It is important to notice that although a higher water loss was observed in run 3 compared with the other two experimental conditions studied, water loss did not have a negative effect on CO<sub>2</sub> production rate (Fig. 6). The use of fans promoting air circulation by convection in the headspace can easily be achieved without modification to or redesign of bioreactors already constructed.

## GENERAL DISCUSSION

Metabolic water ( $W_{met}$ ) does not significantly contribute to water content in the fermentation bed for all the conditions studied. In the first time intervals of the experimental conditions, notable water evaporation took place in the fermentation bed. In run 1, 0.100 g g<sub>IS</sub><sup>-1</sup> of water was evaporated, which represents 25% of the total during fermentation at 6.67 h. In runs 2 and 3, 0.066 and 0.085 g g<sub>IS</sub><sup>-1</sup> of water was evaporated (17% and 20% of total water evaporated, respectively) at 10.17 and 11.25 h. Although there is a difference in time intervals, this water evaporation is caused by drying not associated with metabolic activities. This drying is caused by the initial temperature conditions (Fig. 4) in which the fermentation bed temperatures were lower than those observed in the headspace of the bioreactor.

In contrast to previous work, where evaporation has been neglected<sup>12,13</sup> or considered as a diffusion process,<sup>14,15</sup> in the present work it was considered as a convective process, affected by air flow conditions ( $N_{Re}$ ) through the headspace of the tray bioreactor with a convective mass transfer coefficient.

As shown in Table 4, the mass transfer coefficient ( $k_m$ ) changed during fermentation. The variation of  $k_m$  during the sample intervals is not clearly related to the variation of the internal terms of mass balance ( $W_{met}$ ,  $W_{evap}$ , and water loss) shown in Table 4. For application of the mathematical model proposed here, an average value for  $k_m$  was obtained for the time intervals after the lag phase (Table 6).

This work supports the importance of water balance in the SSF process, in the estimation of mass transfer coefficients that have not been previously considered.<sup>8</sup>

Table 5 shows values for the elements of the energy balance at different time intervals for the experimental conditions studied. Those values were obtained from Equations (6) and (7). For all the conditions studied (runs 1 to 3) the main mechanism for heat removal after the lag phase was by sensible heat transfer ( $Q_{sen}$ ). During the lag period, for all experimental conditions, when there was no metabolic heat generation ( $Q_{met}$ ), there was a supply of heat (positive values) from the headspace to the fermentation bed due to the lower temperature of the fermentation bed than that of the inlet air. Air supply was responsible for water evaporation (also observed in the values of  $Q_{evap}$ ) from the fermentation bed, as previously detailed, under the initial operating conditions studied in this work. The absence of  $Q_{met}$  during the first phase (lag phase) corroborates the CO<sub>2</sub> production data.

In previous work,<sup>12–15</sup> the heat and mass transfer coefficients used in the proposed balances and models were obtained from values or correlations reported in other sources. Heat transfer coefficients used are for similar materials, but not the same,<sup>12–14</sup> or were obtained from correlations with air-drying operations.<sup>15</sup> This causes under- or over-estimation of the heat transfer coefficient, which generates a bad fit between experimentally measured and model-predicted values of the studied variables (temperature and moisture content).

As shown in Table 5, the heat transfer coefficients changed during fermentation. The variation of  $h_c$  and  $U_t$  during the sample intervals is not clearly related to the variation of the internal terms of heat balance ( $Q_{acum}$ ,  $Q_{met}$ ,  $Q_{evap}$  and  $Q_{sen}$ ) shown in Table 5. For application of the mathematical model proposed here, an average value for each coefficient was obtained for the time intervals after the lag phase (Table 6). In the case  $T_a > T_b$  heat ( $U_t$  and  $h_c$ ) and mass ( $k_m$ ) transfer coefficients were not calculated because the model cannot be applied.

The strategy used to estimate the heat transfer coefficient is similar to that used in previous work; however, Nagel *et al.*<sup>30</sup> combined the heat transfer coefficient and the heat transfer area in a single parameter. In contrast, in this work, where the use of an SSF tray bioreactor allows the design of the transfer area, the mass and heat transfer coefficients were estimated accurately.

The present study proposed integral water and heat balances for estimating mass and heat transfer coefficients. The individual transfer coefficients obtained for each interval between sampling (Tables 4 and 5) allowed evaluation of the average heat transfer coefficient for each run (Table 6). Changes in the water content and overall composition of the fermentation bed during the cultivation period, due to biomass production and substrates consumption, for all runs, were responsible for changes in mass and heat transfer coefficients.

## CONCLUSIONS

The strategy presented in this work allows the quantitative evaluation of the effect of the fermentation bed height and forced internal air circulation in a tray bioreactor for SSF on the removal of metabolic heat. Increasing the air circulation rate (from  $N_{Re}$  2.5 to  $N_{Re}$  2839) improved the heat removal without drying the fermentation bed. The proposed mathematical model, using the transfer coefficients obtained by energy and water balances, accurately predicted the profiles of temperature and moisture content in the fermentation process. The model can be used to optimize design and operating conditions, such as the fermentation bed height and air circulation velocities, of tray bioreactors for SSF. To our knowledge, this is the first report describing the effect of  $N_{Re}$  on the gaseous phase in a SSF tray bioreactor and on the heat and mass transfer coefficients.

## REFERENCES

- Cannel E and Moo-Young M, Solid-state fermentation systems. *Process Biochem* **15**:2–7 (1980).
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol C and Nigam P, Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* **77**:149–162 (1999).
- Vrije T, Antoine N, Buitelaar R, Bruckner S, Dissevelt M, Durant A, *et al*, The fungal biocontrol agent coniothyrium minitans: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**:58–68 (2001).
- Robinson T, Singh D and Nigam P, Solid-state fermentation: a promising technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:284–289 (2001).
- Pandey A, Soccol CR, Rodríguez-León JA and Nigam P, *Solid-state Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*. Asiatech Publishers, New Delhi (2001).
- Saucedo-Castañeda G, Gutiérrez-Rojas M, Bacquet G, Rimbault M and Viniestra-González G, Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol Bioeng* **25**:802–808 (1990).
- Saucedo-Castañeda G, Lonsane BK and Rimbault M, Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid-state fermentation system. *Process Biochem* **27**:97–107 (1992).
- Mitchell DA, von Meien OF and Krieger N, Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem Eng J* **13**:137–147 (2003).
- Durand A, Bioreactors design for solid state fermentation. *Biochem Eng J* **13**:113–125 (2003).
- Mitchell DA, Lonsane BK, Durand A, Renaud R, Almanza S, Maratray J, *et al*, General principles of reactor design and operation for SSC, in *Solid Substrate Cultivation*, ed by Doelle HW, Mitchell DA and Rolz CE. Elsevier, England, pp. 115–136 (1992).
- Szewczyk KW, The influence of heat and mass transfer on solid state fermentation. *Acta Biochim Pol* **40**:90–92 (1993).
- Rajagopalan S and Modak JM, Heat and mass transfer simulation studies for solid-state fermentation processes. *Chem Eng Sci* **49**:2187–2193 (1994).
- Rajagopalan S and Modak JM, Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process in tray bioreactor. *Bioprocess Eng* **13**:161–169 (1995).
- Smits JP, van Sonsbeek J, Tramper J, Knol W, Geelhoed M, Peeters M, *et al*, Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. *Bioprocess Eng* **20**:391–404 (1999).
- Khanahmadi M, Roostaazad R, Safekordi A, Bozorgmehri R and Mitchell DA, Investigating the use of cooling surfaces in solid-state fermentation tray bioreactors: modelling and experimentation. *J Chem Technol Biotechnol* **79**:1128–1242 (2004).
- Chen HZ, Xu FJ, Tian ZH and Li ZH, A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation. *J Biosci Bioeng* **93**:211–214 (2002).
- Xu FJ, Chen HZ and Li ZH, Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzyme Microbiol Technol* **30**:45–48 (2002).
- Chen HZ, Xu FJ and Li ZH, Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. *Biochem Eng J* **23**:117–122 (2005).
- Ooijkaas LP, Weber FJ, Buitelaar RM, Tramper J and Rinzeema A, Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol* **18**:356–360 (2000).
- Gutiérrez-Rojas M, Auria R, Benet J and Revah S, A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. *Chemical Eng J* **60**:189–198 (1995).
- Gutiérrez-Rojas M, Hosn SAA, Auria R, Revah S and Favela-Torres E, Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochem* **31**:363–369 (1996).
- Pontecorvo G, The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**:141–238 (1953).
- Nielsen J, Villadsen J and Liden G, *Bioreaction Engineering Principles*, 2nd edn. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 53–60 (2003).
- McCabe WL, Smith JC and Harriot P, *Drying of Solids*, in *Unit Operations of Chemical Engineering*, 6th edn. McGraw Hill, New York, pp. 773–811 (2000).
- Himmelblau DM, *Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering*, 6th edn. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ (1996).
- Perry RH, Green DW and Maloney JO, *Perry's Chemical Engineer's Handbook*, 7th edn. McGraw-Hill, New York (1999).
- Mitchell DA, Krieger N and Berovic M, Group I bioreactors: unaerated and unmixed, in *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and Operation*, ed by Mitchell DA, Krieger N and Berovic M. Springer, Germany, pp. 65–76 (2006).
- Levenspiel O, *Chemical Reaction Engineering*, 3th edn. John Wiley & Sons, Inc, New York (1999).
- Mitchell DA, Nascimento-Cunha LE, Lopes-Machado AV, de Lima-Luz LF and Krieger N, A model-based investigation of the potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* **48**:195–203 (2010).
- Nagel FJJI, Tramper J, Bakker MSN and Rinzeema A, Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol Bioeng* **72**:219–230 (2001).