

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
*Iztapalapa*



**Casa abierta al tiempo**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS DE MAESTRÍA

**DISEÑO, ARRANQUE Y CARACTERIZACIÓN DE UN  
BIORREACTOR DE CHAROLAS PARA FERMENTACIÓN EN  
MEDIO SÓLIDO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA  
**I.B.I. ALEJANDRO BARRIOS NOLASCO**

DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN  
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA  
DR. SERGIO HUERTA OCHOA

DIRECTOR  
CO-DIRECTOR  
ASESOR

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados del CONACyT, en el nivel de Competencia Internacional, con la referencia 001465.

México, D. F. a 15 de diciembre del 2015

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

**DISEÑO, ARRANQUE Y CARACTERIZACIÓN DE UN  
BIORREACTOR DE CHAROLAS PARA  
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

que presentó

**IBI ALEJANDRO BARRIOS NOLASCO**

**Comité Tutorial:**

Directora: Dra. Lilia Arely Prado Barragán  
Co-Director: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza  
Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa

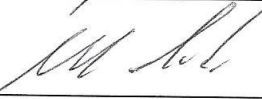
**Jurado:**

Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Presidente



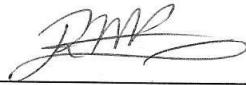
---

Dr. Manuel A. Lizardi Jiménez  
Secretario



---

Dr. Rodrigo Melgarejo Torres  
Vocal



---

Dr. J. Juan Buenrostro Figueroa  
Vocal



---



---

---

## RESUMEN

En años recientes ha existido un gran interés en los procesos de fermentación en medio sólido (FMS) por los altos rendimientos que se han obtenido en la producción de metabolitos de alto valor agregado de interés industrial, por lo que se han llevado a cabo investigaciones en el diseño de biorreactores en busca de que sean aplicados a nivel industrial.

En este trabajo se diseñó y construyó un biorreactor de charolas a escala de banco y se caracterizaron los distintos mecanismos de transporte y reacción en el sistema mediante métodos experimentales y a través de la dinámica de fluidos computacionales empleando el software COMSOL® Multiphysics.

Se construyó un modelo en frío del biorreactor de charolas en acrílico de ½ pulgada de espesor considerándose la adaptación de sensores de gas O<sub>2</sub>, gas CO<sub>2</sub>, temperatura y humedad relativa. Se eligió como material de sellado una junta tipo *o-ring* de neopreno de geometría circular (4.7 mm diámetro) y densidad de 1.45 g/cm<sup>3</sup> para sellar bien la unión de los módulos que componen el biorreactor. La charola se construyó con malla (# 40) de acero inoxidable y el difusor de aire tipo serpentín se construyó con tubo de acero inoxidable de ¼ pulgada de diámetro. El medio poroso de empaque del biorreactor consistió en una mezcla de subproductos de frutas y verduras y pasta de soya con un tamaño de partícula: 1.68 > TP > 1.41 mm.

Se evaluó el transporte de masa por dispersión por el método de inyección de un pulso o trazador y se calculó el coeficiente de dispersión ( $D/uL$ ) que caracteriza la dispersión en todo el sistema mediante el análisis de las curvas de distribución de tiempos de residencia (DTR) en donde se obtuvieron valores de ( $D/uL$ ) de 0.123, 0.196 y 0.220 para los flujos de 200, 300 y 400 mL/min respectivamente.

Se evaluó el transporte de calor en el lecho empacado de los mecanismos conductivos y convectivos en la determinaron del perfil radial y axial de temperatura respectivamente a diferentes flujos de aireación con una temperatura del aire de 20 °C observándose gradientes radiales de 0.5, 0.58 y 0.63 °C/cm y gradientes axiales de 2.5, 2.9 y 3.5 °C/cm para flujos de 200, 300 y 400 mL/min respectivamente.

Se evaluó la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en fermentación en medio sólido en el biorreactor de charolas, obteniéndose la mayor actividad (40.1 U/g<sub>MS</sub>) a las 36 h de cultivo utilizando como sustrato subproductos de frutas y verduras-pasta de soya. Posteriormente se realizó un balance estequiométrico a partir de los datos de producción de CO<sub>2</sub> obtenidos

---

mediante el monitoreo en línea con el sensor de gas CO<sub>2</sub> durante la fermentación. Así mismo, mediante un ajuste de datos de CO<sub>2</sub> con el modelo logístico ( $R^2 > 0.99$ ) se determinaron los parámetros cinéticos aparentes: tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> ( $r_{CO_2max} = 11.83 \text{ mg}_{CO_2}/\text{g}_{MS}h$ ), tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2} = 0.53 \text{ h}^{-1}$ ), producción total de CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2final} = 154.83 \text{ mg}_{CO_2}/\text{g}_{MS}$ ) y el tiempo de fase “Lag” con un valor de 6.83 h.

Finalmente se modeló el biorreactor utilizando la dinámica de fluidos computacionales en el software COMSOL® Multiphysics 4.4. El modelado del biorreactor se realizó considerando un sistema abiótico en donde se determinó el perfil hidrodinámico a diferentes flujos de aireación, así mismo el acoplamiento de las ecuaciones de transporte de masa y calor al modelo hidrodinámico permitieron obtener los perfiles de transferencia de O<sub>2</sub> y calor en el biorreactor a diferentes intervalos de tiempo, en donde se obtuvo una diferencia de 2.2 °C para la temperatura comprendida entre la superficie y la base del lecho empacado. Por otro lado se modeló el biorreactor considerando un sistema biótico en donde se obtuvieron los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>, así mismo mediante un análisis de sensibilidad se obtuvieron los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> a diferentes tasas específicas de crecimiento ( $\mu_X$ ) a valores de 0.23 a 0.66 h<sup>-1</sup> donde se observó que a mayor valor de  $\mu_X$  (0.66 h<sup>-1</sup>) la curva del perfil de producción de CO<sub>2</sub> es más estrecha y se obtiene una tasa de producción de CO<sub>2</sub> mayor (11.83 mg<sub>CO2</sub>/g<sub>MS</sub>h) en comparación con los obtenidos (6.58 mg<sub>CO2</sub>/g<sub>MS</sub>h) a valores más bajos (0.23 h<sup>-1</sup>) de  $\mu_X$ .

---

---

**INTRODUCCIÓN**

<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>1.1. Subproductos de la industria alimentaria</b> .....	3
<b>1.1.1. Frutas y Verduras</b> .....	3
<b>1.2. Valorización de subproductos de la industria alimentaria</b> .....	5
<b>1.3. Fermentación en medio sólido</b> .....	6
<b>1.4. Tipos de biorreactores para FMS</b> .....	7
<b>1.4.1. Biorreactores de charola</b> .....	7
<b>1.4.2. Biorreactores de lecho empacado</b> .....	8
<b>1.4.4. Biorreactores agitados</b> .....	11
<b>1.4.5. Biorreactores de lecho fluidizado aire-sólido</b> .....	11
<b>1.5. Modelamiento de biorreactores de charola</b> .....	13
<b>1.5.1. Balances de masa y energía</b> .....	14
<b>1.5.1.1. Balances de calor</b> .....	15
<b>1.5.1.2. Balances de oxígeno</b> .....	16
<b>1.5.2. Dinámica de Fluidos Computacionales</b> .....	17
<b>2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1. Diseño y construcción del biorreactor de charolas</b> .....	22
<b>4.2. Operación del biorreactor</b> .....	26
<b>4.2.1. Hermeticidad</b> .....	26
<b>4.2.2. Medio poroso</b> .....	27
<b>4.2.2.1. Composición elemental del medio poroso</b> .....	28
<b>4.2.3. Cálculo de propiedades físicas y termodinámicas del medio poroso</b> ...	29
<b>4.2.3.1. Densidad real de sólido</b> .....	29
<b>4.2.3.2. Conductividad térmica del medio poroso</b> .....	30
<b>4.2.3.3. Conductividad térmica del medio poroso</b> .....	31
<b>4.2.3.4. Capacidad calorífica</b> .....	31
<b>4.2.3.5. Propiedades físicas y termodinámicas del medio poroso</b> .....	32
<b>4.2.4. Transferencia de calor</b> .....	33
<b>4.2.5. Transferencia de oxígeno</b> .....	34
<b>4.2.5.1. Distribución de Tiempos de Residencia (DTR)</b> .....	34
<b>4.3. Sistema biótico</b> .....	38

---

---

4.3.1.	Microorganismo.....	38
4.3.2.	Conservación del microorganismo .....	38
4.3.3.	Preparación del inóculo.....	38
4.3.4.	Medio de cultivo.....	39
4.3.5.	Cultivo en el biorreactor de charolas.....	39
4.3.6.	Monitoreo de la temperatura en el biorreactor .....	40
4.4.	Métodos analíticos.....	40
4.4.1.	Respirometría.....	40
4.4.2.	Obtención del extracto enzimático.....	42
4.5.	Modelamiento del biorreactor por CFD.....	43
4.5.1.	Hidrodinámica.....	43
4.5.2.	Modelado de la transferencia de masa.....	44
4.5.3.	Modelado de transferencia de energía .....	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
5.1.	Diseño y construcción.....	47
5.2.	Estudios abióticos .....	50
5.2.1.	Hermeticidad.....	50
5.2.2.	Transferencia de calor .....	51
5.2.3.	Distribución de tiempos de residencia (DTR).....	54
5.3.	Fermentación en medio sólido (Sistema biótico).....	57
5.3.1.	Monitoreo en línea de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> (Respirometría).....	58
5.3.2.	Estimación de parámetros cinéticos aparentes.....	58
5.3.3.	Balance estequiométrico.....	62
5.4.	Calor de reacción .....	64
5.5.	Modelado del biorreactor mediante CFD .....	67
5.5.1.1.	Transporte de momento .....	67
5.5.1.2.	Transporte de masa de oxígeno en el sistema abiótico .....	70
5.5.1.3.	Transporte de calor en el sistema abiótico .....	72
5.5.2.1.	Biorreacción .....	74
6.	CONCLUSIONES.....	78
7.	PERSPECTIVAS.....	80
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	81



---

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.1.</b> Porcentaje en peso de restos de frutas y verduras.	4
<b>Tabla 1.2.</b> Productos obtenidos a partir de subproductos de frutas y verduras por FMS.	6
<b>Tabla 1.3.</b> Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de biorreactores.	13
<b>Tabla 4.1.</b> Propiedades del acrílico.	23
<b>Tabla 4.2.</b> Propiedades físicas de las juntas de neopreno.	27
<b>Tabla 4.3.</b> Composición de los componentes del medio poroso.	28
<b>Tabla 4.4.</b> Propiedades físicas y termodinámicas del medio poroso.	32
<b>Tabla 4.5.</b> Parámetros de operación en estudios abióticos.	33
<b>Tabla 4.6.</b> Medio de cultivo para FMS.	39
<b>Tabla 4.7.</b> Parámetros del modelo.	46
<b>Tabla 5.1.</b> Gradientes radiales de temperatura a diferentes profundidades del lecho.	53
<b>Tabla 5.2.</b> Parámetros de las curvas DTR experimentales.	57
<b>Tabla 5.3.</b> Parámetros cinéticos aparentes del cultivo de <i>Y. lipolytica</i> .	61
<b>Tabla 5.4.</b> Coeficientes de rendimiento obtenidos a partir de los balances elementales (C, H, O y N) en base al CO <sub>2</sub> producido de la ecuación de reacción para el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> .	63
<b>Tabla 5.5.</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>Y. lipolytica</i> .	64

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 4.1.</b> (A) Distribución de las zonas en el biorreactor (vista superior); (B) Registro de temperatura a diferentes alturas del lecho.	34
<b>Figura 4.2.</b> Esquematización del método de inyección de trazador (aire).	36
<b>Figura 4.3.</b> Perfil de la tasa de producción de CO <sub>2</sub> y de la producción acumulada de <i>Y. lipolytica</i> en cultivo en biorreactor de charolas.	41
<b>Figura 4.4.</b> Ajuste de la etapa II de los datos de producción de CO <sub>2</sub> de <i>Y. lipolytica</i> al modelo logístico	42
<b>Figura 4.5.</b> Sección transversal del biorreactor	43
<b>Figura 5.1.</b> Esquema explosionado del diseño del biorreactor de charolas.	48
<b>Figura 5.2.</b> Diferentes vistas del diseño del biorreactor de charolas.	49
<b>Figura 5.3.</b> Instrumentación del biorreactor.	50
<b>Figura 5.4.</b> . Efecto del tipo de junta sobre el perfil de presión en el biorreactor. (X) cordón de neopreno; (Δ) espuma de neopreno.	51
<b>Figura 5.5.</b> Perfil radial de temperatura para una profundidad del lecho de 0mm.	52
<b>Figura 5.6.</b> Perfil radial de temperatura para una profundidad del lecho de 10mm	52
<b>Figura 5.7.</b> Perfil radial de temperatura para una profundidad del lecho de 20mm	52
<b>Figura 5.8.</b> Perfil axial de temperatura.	53
<b>Figura 5.9.</b> Curvas de dispersión de O <sub>2</sub> para un flujo de 200 mL/min	55
<b>Figura 5.10.</b> Curvas de dispersión de O <sub>2</sub> para un flujo de 300 mL/min	55
<b>Fig. 5.11.</b> Curvas de dispersión de O <sub>2</sub> para un flujo de 400 mL/min	56
<b>Figura 5.12.</b> Diagrama de flujo para la producción de proteasas por FMS.	57
<b>Figura 5.13.</b> Esquema general para la dilución del gas CO <sub>2</sub> .	58

---

<b>Figura 5.14.</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> ( $\Delta$ ); Tasa de consumo de O <sub>2</sub> (x).	60
<b>Figura 5.15.</b> Producción de proteasas por <i>Y. lipolytica</i> en un biorreactor de charolas.	62
<b>Figura 5.16.</b> Perfil de temperatura (- · -) y tasa de producción de CO <sub>2</sub> ( $\Delta$ ) durante el cultivo de <i>Y. lipolytica</i> .	65
<b>Figura 5.17.</b> a) Dibujo del biorreactor en COMSOL; b) Malleo generado en COMSOL.	68
<b>Figura 5.18.</b> Superficie de flechas del transporte de momento en el biorreactor para un flujo de aireación de 400 mL/min.	68
<b>Figura 5.19.</b> Simulaciones del efecto del flujo de aireación sobre la hidrodinámica en el biorreactor de charolas.	69
<b>Figura 5.20.</b> Perfil de magnitud de velocidad radial en el lecho empacado para un flujo de 300 mL/min.	70
<b>Figura 5.21.</b> Perfil de concentración de O <sub>2</sub> en el biorreactor a diferentes flujos de aireación.	71
<b>Figura 5.22.</b> Perfil de concentración de O <sub>2</sub> en el biorreactor	72
<b>Figura 5.23.</b> Perfil de temperatura en el biorreactor a diferentes flujos de aireación.	73
<b>Figura 5.24.</b> Perfil axial de temperatura.	74
<b>Figura 5.25.</b> Perfil de CO <sub>2</sub> obtenido mediante simulación en COMSOL con $\mu_X=0.53 \text{ h}^{-1}$ .	75
<b>Figura 5.26.</b> Perfil de la tasa de producción de CO <sub>2</sub> experimental y simulado.	76
<b>Figura 5.27.</b> Perfil de la tasa de producción de CO <sub>2</sub> a diferentes tasas de crecimiento ( $\mu_X$ ).	77

---



---

## ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>PDA</b>	Agar papa dextrosa	<b>FMS</b>	Fermentación en medio sólido
$C_{CO_2max}$	Cantidad máxima producida de CO <sub>2</sub>	<b>mp</b>	Fracción másica de la proteína
<b>Cp</b>	Capacidad calorífica del medio poroso	<b>ma</b>	Fracción másica de las cenizas
$D/uL$	Coefficiente de dispersión axial	<b>mf</b>	Fracción másica de las grasas
$h_w$	Coefficiente de transferencia de calor	<b>mc</b>	Fracción másica de los carbohidratos
$k_{ap}$	Conductividad térmica aparente del medio poroso	<b>mw</b>	Fracción másica del agua
$k_{fi}$	Conductividad térmica de la fibra	$X_b$	Fracción másica del medio poroso
$k_a$	Conductividad térmica de las cenizas	$X_{va}$	Fracción volumétrica de espacio vacío
$k_f$	Conductividad térmica de las grasas	$X_{vi}$	Fracción volumétrica del compuesto i
$k_c$	Conductividad térmica de los carbohidratos	$X_{vb}$	Fracción volumétrica del medio poroso
$k_w$	Conductividad térmica del agua	$g_{MS}$	Gramo de materia seca
$\rho_{ap}$	Densidad aparente del medio poroso	<b>n</b>	Número de moles
$\rho_p$	Densidad de la proteína	$Y_i$	Rendimiento compuesto i
$\rho_a$	Densidad de las cenizas	<b>rCO<sub>2</sub></b>	Tasa de producción de CO <sub>2</sub>
$\rho_{fi}$	Densidad de las fibras	<b>μCO<sub>2</sub></b>	Tasa específica de producción de CO <sub>2</sub>
$\rho_f$	Densidad de las grasas	<b>μx</b>	Tasa específica de crecimiento
$\rho_c$	Densidad de los carbohidratos	<b>θ</b>	Tiempo adimensional
$\rho_w$	Densidad del agua	$\bar{t}$	Tiempo medio de transito
$\rho_i$	Densidad del componente i	<b>U</b>	Unidades de enzima
$\rho_{bs}$	Densidad real del medio poroso	$\sigma^2$	Varianza
<b>CFD</b>	Dinámica de fluidos computacionales	<b>FMS</b>	Fermentación en medio sólido
<b>DTR</b>	Distribución de tiempos de residencia	<b>mp</b>	Fracción másica de la proteína
$\Delta H_{C_{Productos}}$	Entalpía de combustión de productos	<b>ma</b>	Fracción másica de las cenizas
$\Delta H_{C_{Reactivos}}$	Entalpía de combustión de reactivos	<b>mf</b>	Fracción másica de las grasas
$\Delta H_r$	Entalpía de reacción	<b>mc</b>	Fracción másica de los carbohidratos
		<b>mw</b>	Fracción másica del agua

## INTRODUCCIÓN

La fermentación en medio sólido se caracteriza por el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos húmedos con bajo contenido de agua libre y aire como fase continua (Hölker y col. 2005; Nava, 2003; Schutyser y col. 2003).

La FMS ha acumulado credibilidad en los últimos años en la industria biotecnológica debido a su potencial en la producción de metabolitos biológicamente activos, biocombustibles, aditivos alimenticios, productos químicos industriales y farmacéuticos, entre otros. El empleo de subproductos orgánicos como sustratos en los procesos de FMS ofrece una vía alternativa y de adición de valor a estos subproductos que regularmente son escasamente o no utilizados por las industrias que los generan (Singhania y col. 2008).

A pesar de los avances tecnológicos en los procesos de FMS en los últimos años, no se ha prestado la suficiente atención por parte de los investigadores en cuanto al diseño de biorreactores se refiere, sin embargo; los avances logrados por pioneros en este campo de la ingeniería ofrecen una vía útil para abrir camino en el diseño de este tipo de sistemas de biorreacción por lo que es un área de la biotecnología que se encuentra en constante desarrollo (Ruiz y col. 2007).

Los biorreactores de FMS involucran dos modos de operación: estáticos (de charolas y lecho empacado o columna) y agitados (tanque horizontal, lecho fluidizado y tambor rotatorio). La transferencia de calor y masa ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y agua) se ha estudiado ampliamente en biorreactores de lecho empacado y agitado (Mitchell y col. 2003). Sin embargo, aunque los biorreactores de charola se han empleado desde hace mucho tiempo y son considerados el tipo de biorreactor de FMS más simple (Durand, 2003; Mitchell y col. 1992; Pandey y col. 2001), se han publicado pocos estudios relacionados con la transferencia de calor y masa (Figueroa-Montero, 2011; Khanahmadi y col. 2004; Rajagopalan y col. 1994 y 1995; Smits y col. 1999; Szewczyk, 1993) y estudios que incorporan el modelado (Chen, 2013; Jou y col. 2011; Lian y col. 2002) en este tipo de biorreactores.

El modelado es una herramienta ingenieril que ha permitido por un lado llevar a cabo el diseño conceptual de diversos sistemas de biorreacción (Froment y col. 2011) y por otro entender la compleja interacción entre los distintos fenómenos de transferencia y reacción que tienen lugar en dicho sistema, lo que ha permitido su optimización. Hasta hace tres décadas, el modelado se había visto limitado por restricciones en el tiempo de cómputo. En

la actualidad el avance en computación ha permitido el desarrollo de modelos más sofisticados, incluso al nivel de la Dinámica de Fluidos Computacionales (CFD) (Fromenty col. 2011), un enfoque que permite modelar la configuración “real” del sistema de biorreacción de interés y, a su vez, tener un mayor entendimiento sobre el comportamiento y efecto de la hidrodinámica del fluido reaccionante en los distintos procesos de transferencia de calor, masa y cinéticos a nivel local en este sistema (Parsa y col. 2014).

La importancia del empleo de biorreactores de charola en FMS radica no solo en la simplicidad del diseño, lo que representa una cualidad muy importante en este tipo de sistemas debido a que se reducen costos de operación y energéticos ya que regularmente no son equipos automatizados debido al modo de operación estático. Por otro lado, dada la facilidad para el escalamiento de este tipo de biorreactores, representa una gran ventaja caracterizarlos como en este caso a escala de banco ya que emulan el comportamiento de los equipos empleados a nivel industrial.

En este trabajo se diseñó y construyó un modelo en frío de un biorreactor de charolas para FMS a escala de banco y se caracterizaron los distintos mecanismos de transporte y reacción de manera experimental y mediante el modelado utilizando el enfoque CFD. En el capítulo 1 se presenta una revisión bibliográfica que engloba en un mismo contexto la generación de subproductos de la industria de frutas y verduras y otros residuos orgánicos y su aprovechamiento en procesos de FMS, así también el modelamiento de este tipo de sistemas mediante CFD en programas computacionales. En los capítulos 2 y 3 se presenta la justificación y objetivos de este trabajo. Posteriormente en el capítulo 4 se muestran a detalle los materiales y métodos empleados en las diferentes etapas experimentales. En el capítulo 5 se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas que permitieron llegar a las conclusiones contenidas en el capítulo 6.

## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Subproductos de la industria alimentaria**

En la actualidad el alto desarrollo de la industria conlleva a la generación de residuos. En el proceso productivo de los alimentos, además del producto deseado, se generan subproductos, residuos y productos fuera de norma, cada uno de los cuales pueden servir para consumo humano o animal y aplicación industrial, lo que traería beneficios económicos. Sin embargo, la mayoría de este tipo de industrias no tiene algún plan para estos subproductos, debido al alto costo de su reutilización y por el contrario, los ubican junto con la basura en los vertederos o rellenos sanitarios (Yepes y col. 2008).

Un “subproducto” es un producto secundario, bien conocido, generalmente útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial. El término “residuos”, se aplica a aquellos que pueden tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, sin embargo, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su utilización. Desde este punto de vista, los términos “subproducto” y “residuo” podrían utilizarse como sinónimos (Saval, 2012). Los subproductos de la industria agroalimentaria pueden ser de origen animal o vegetal, y se pueden dividir en siete grupos: (I) cereales, (II) raíces y tubérculos, (III) plantas oleaginosas, (IV) frutas y verduras, (V) productos cárnicos, (VI) pescados y mariscos y (VII) productos lácteos (Galanakis, 2012).

#### **1.1.1. Frutas y Verduras**

Los residuos vegetales se producen en grandes cantidades en los mercados, en las zonas de producción intensiva y en las empresas de envasado de sus conservas, y constituyen una importante fuente de molestias en los vertederos municipales, donde generalmente son depositados, debido a su elevada biodegradabilidad (Alonso y col. 2006). Se estima que a nivel nacional se producen cerca de 12, 754, 218 toneladas de subproductos de frutas y verduras anualmente (INEGI 2013). Debido a que la producción y procesamiento de frutas y cereales ha crecido a nivel mundial, la generación de estos subproductos sigue en aumento (Godoy y col. 2014).

En la mayoría de los procesos industriales que utilizan frutas, tanto las cáscaras como las semillas suelen ser consideradas como un subproducto (Hermoso y col. 2004). Un claro ejemplo son los cítricos ya que de este tipo de frutas sólo se consume una pequeña parte, generando subproductos constituidos por cáscaras y semillas que son desechadas durante la producción de jugos y alimentos (Mirabella y col. 2014). Los subproductos cítricos representan hasta un 50 % de la masa total del fruto (Marín y col. 2007). En la Tabla 1.1 se muestran los porcentajes de restos generados en función de la materia prima procesada.

**Tabla 5.1.** Porcentaje en peso de subproductos de frutas y verduras (Loanis y col. 2008; Ros y col. 2012).

<b>Materia prima</b>	<b>Tipo de subproductos</b>	<b>% peso total</b>
<b>Jitomate</b>	Piel, semillas, corazón	15
<b>Pimiento morrón</b>	Corazones, Piel	50-60
<b>Espárrago</b>	Piel, trozos	51
<b>Alcachofa</b>	Brácteas, tallos	60-65
<b>Champiñón</b>	Corte raíz,	21
<b>Brotes de ajo</b>	Partes blancas	17
<b>Cardo</b>	Penca, hoja, corazón	65
<b>Acelga</b>	Pencas, hojas	48
<b>Espinacas</b>	Hojas secas	13
<b>Melocotón</b>	Piel, huesos	22-28
<b>Ciruela, albaricoque</b>	Piel, huesos	10-25
<b>Naranja, mandarina</b>	Cáscara, corteza, semillas	40-45
<b>Naranja zumo</b>	Cáscara, corteza, semillas	60-65
<b>Pera</b>	Piel, pecíolos, corazón	42-45
<b>Uva</b>	Piel, semilla	20
<b>Plátano</b>	Cáscara	30
<b>Guayaba</b>	Piel	10-15
<b>Pasiflora</b>	Cáscara, semillas	75
<b>Kiwi</b>	Piel, corazón	30
<b>Fresa</b>	Pulpa	5
<b>Sandía</b>	Cáscara	15



En la inquietud por minimizar el impacto ecológico que causa la generación y la mala disposición de los subproductos de la industria de futas y verduras ha creado un interés en el estudio, desarrollo e implementación de nuevas técnicas o métodos para el aprovechamiento de éstos subproductos en la obtención de productos de alto valor agregado.

## **1.2. Valorización de subproductos de la industria alimentaria**

En las últimas décadas, se han desarrollado y perfeccionado técnicas para el aprovechamiento y la valorización de los subproductos de la industria agroalimentaria, utilizando principalmente técnicas biotecnológicas (Godoy y col. 2014). Por ejemplo, la producción de enzimas de interés industrial principalmente de aquellas que son inducibles entre las que destacan: las proteasas, lipasas, celulasas y pectinasas.

Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, es necesario caracterizarlos para conocer su composición química general, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, ya que con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. Como cualquier proceso, después del aprovechamiento de un residuo se genera un siguiente residuo más agotado que puede tener otra aplicación, o bien, convertirse en un desecho (Saval, 2012). Las tecnologías actuales deben ser capaces de recuperar, reciclar y dar sustentabilidad a la obtención de ingredientes de alto valor agregado (Galanakis, 2012).

En este sentido, la FMS ofrece una oportunidad para el aprovechamiento de los subproductos de la industria agroalimentaria. Al paso de los años, se han definido criterios de selección de los residuos para ser aprovechados con fines biotecnológicos, algunos de ellos son:

- Que el principal componente del residuo pueda ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales.
- Que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- Que no requiera pretratamiento, y en caso de requerirlo, que éste sea sencillo y económico.

- Que la disponibilidad del residuo permita planificar el proceso para el cual se va a utilizar. En la Tabla 1.2 se muestra la producción de algunos metabolitos microbianos por FMS.

**Tabla 1.6.** Productos obtenidos a partir de subproductos de frutas y verduras por FMS

Subproducto	Metabolito	Microorganismo	Referencia
Cáscara de Piña	Compuestos fenólicos	<i>R. oligosporus</i>	Correia y col. 2004.
Orujo de fresa y manzana	Pectinasa	<i>T. harzianum</i>	Zheng y col. 1998.
Residuos de Cítricos	Pectinasa	<i>A. nainiana</i>	Celestino y col. 2006.
Cáscara de Piña	Etanol	<i>Z. mobilis</i>	Tanaka y col. 1999.
Piñón	Proteasas	<i>A. oryzae</i>	Thanapimmentha y col. 2012.
Kiwi, cáscara de naranja	Laccasa	<i>T. hirsuta</i>	Feron y col. 2000.
Cáscara de melón, pulpa de manzana.	Xylanasa	<i>T. harzianum</i>	Bonnin y col. 2002.
Pulpa de café, residuos cítricos	Celulasa	<i>A. niger</i>	Bramorski y col. 2000.

### 1.3. Fermentación en medio sólido

La fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos sobre matríces sólidas sin escurrimiento de agua (Mendoza y col. 2004). El sustrato debe poseer la suficiente humedad para favorecer el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos. El crecimiento puede ocurrir en la superficie o dentro del sustrato, dependiendo de su estructura porosa (Gervais, 2002). La FMS surge como una tecnología potencial para la producción de productos microbianos tales como alimentos, combustible, productos químicos industriales y farmacéuticos. La FMS ofrece numerosas alternativas en el procesamiento de los subproductos agroindustriales. El uso de estos subproductos como sustratos en procesos de FMS ofrece una vía alternativa para agregar valor a éstos, que de otra forma tendrían un valor nulo o serían considerados como residuos no utilizables. Aunado a lo anterior, los procesos en medios sólidos tienen menores requerimientos de energía, producen menos aguas residuales y son ecológicos, resolviendo el problema de la eliminación de residuos sólidos. (Pandey, 2003). En este sentido, la FMS tiene un enorme

potencial para la producción de enzimas por ejemplo, siendo de especial interés en aquellos procesos en los que los productos fermentados crudos se pueden usar directamente como fuentes de enzimas (Pandey, 1999). En todo proceso que implica FMS hay un equipo crítico donde se forman los productos a obtener, en este caso el equipo donde se lleva a cabo la fermentación es llamado “biorreactor” el cual proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el microorganismo produzca el compuesto bioactivo deseado (Ruiz-Leza y col. 2007).

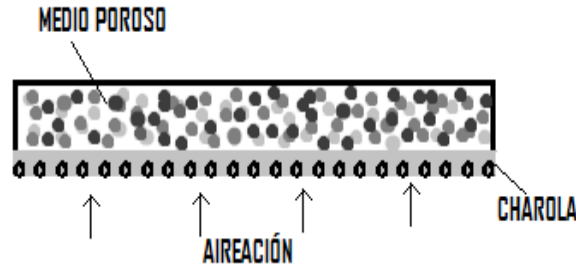
#### **1.4. Tipos de biorreactores para FMS**

Cada tipo de biorreactor que se utiliza en FMS tiene tres subsistemas, la pared del biorreactor, el lecho con el sustrato y los gases del “headspace”. El lecho con el 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 sólida y gaseosa. El arreglo de los subsistemas y su relativa importancia varía con el tipo de biorreactor.

##### **1.4.1. Biorreactores de charola**

Las características básicas del biorreactor de charola son (Mitchell y col. 1992):

- Un lecho con el sustrato relativamente delgado empacado donde se tiene un área transversal al paso de gas de alimentación 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.



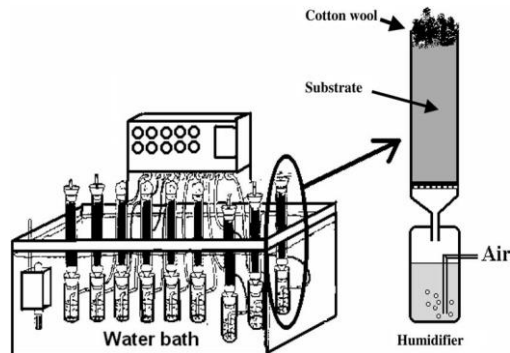
En los procesos de FMS en biorreactor de charola el sustrato sólido es cargado sobre las charolas (hechas de madera, plástico o metal, perforadas o no) en capas delgadas (2 - 15 cm) y colocadas una sobre la otra con un espacio entre ellas de unos pocos centímetros dentro de un cuarto con temperatura controlada. Hay mucha evidencia empírica y experimental (Durand, 2003; Mitchell, 2003; Montero-Figueroa y col. 2011; Pandey, 2003) de las resistencias a la transferencia de calor y masa en las charolas, limitando el espesor del lecho empacado, 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: sólo una delgada capa puede ser usada para evitar sobrecalentamiento y para garantizar condiciones aerobias. La temperatura de entrada, la temperatura del lecho, la humedad relativa y el flujo de aireación son los únicos parámetros externos que pueden ser controlados.

El escalamiento en este caso sigue los principios de ingeniería heurísticos y determinísticos, 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).

#### 1.4.2. Biorreactores de lecho empacado

Los biorreactores de lecho empacado se caracterizan por tener un sustrato estático sobre una placa base a través de la cual 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, también se usan charolas perforadas que pueden ser clasificadas como lechos empacados sobre el criterio de aireación forzada (Lonsane y col. 1985).

La aireación forzada se aplica comúnmente en el fondo; sin embargo, en algunos casos actúa desde la parte más alta de la masa de sustrato (Sugama y col. 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). No obstante, en la mayoría de los casos la temperatura del aire entrante se mantiene constante.



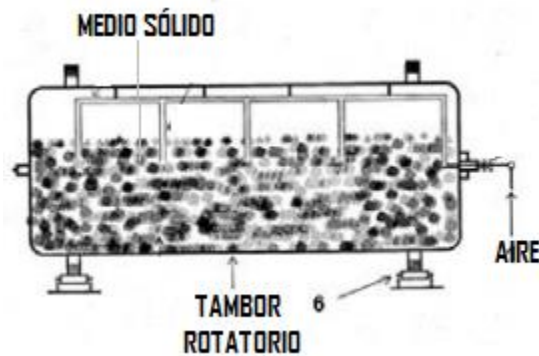
Las columnas pequeñas de hasta 30 cm aproximadamente de longitud pueden ser colocadas en baños de agua para controlar la temperatura (Carrizalez y col. 1981; Okazaki y col. 1979; Raimbault y col. 1980;), mientras que las columnas más grandes pueden ser encaquetadas con un serpentín de agua (Laukevics y col. 1984; Sato y col. 1983). 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 > 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 y permiten un mejor control del proceso (especialmente en la temperatura y la humedad) comparado con los biorreactores 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, baja remoción de calor, y problemas con el escalamiento (Lonsane y col. 1985; Underkofler y col. 1947).

### 1.4.3. Biorreactores de tambor rotatorio

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

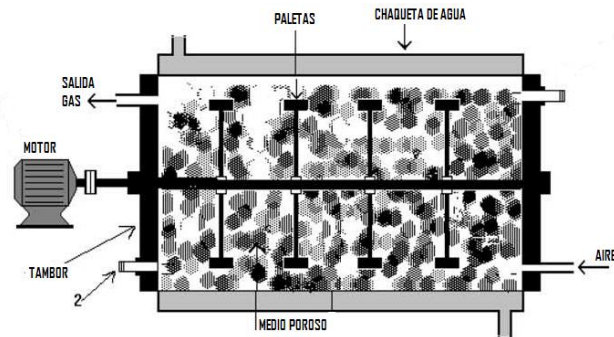
- Un cilindro horizontal o inclinado.
- Rotación del cilindro alrededor de su eje central para causar movimiento de giro del sustrato, el cual puede ser auxiliado por baffles.
- La aireación, cuando se aplica, es con aire alimentado a baja presión dentro del espacio superior (headspace) del biorreactor.



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 a la aglomeración de partículas del sustrato y/o a la reducción de partícula, lo cual 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).

#### 1.4.4. 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).

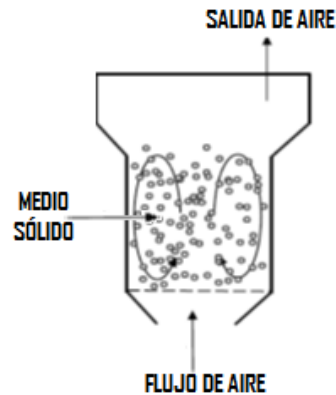


#### 1.4.5. Biorreactores de lecho fluidizado aire-sólido

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):

- Una columna relativamente alta.
- Una base perforada, por la cual pase el aire (u otro gas) inyectado con suficiente velocidad para que las partículas floten.

- Un dispositivo de agitación especializado que pueda ser incluido para auxiliar en la agitación de los sólidos.



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

- Una buena aireación, permitiendo el buen crecimiento de organismos aerobios. Las células en biorreactores de lecho fluidizado aire sólido son capaces de tener tasas de respiración 10 veces más grandes.
- El sobrecalentamiento no es un problema ya que el calor metabólico es removido por la corriente de aire.
- Se logra un mezclado altamente efectivo, evitando problemas de gradientes de temperatura y del contenido de humedad dentro de los biorreactores.
- Se pueden obtener productividades mayores a las observadas en procesos de FMS tradicionales, resultando en ahorro de espacio en las plantas.



**Tabla 1.7.** Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de biorreactores (Ruiz-Leza y col. (2007))

Biorreactor	Ventajas	Desventajas
Charolas	Económico, fácil operación y mantenimiento.	En operaciones a gran escala no son fácilmente automatizados y por lo tanto hacen uso extensivo de mano de obra. Requieren una gran área operacional y es difícil aplicarlo a procesos estériles
Columnas	Económico, fácil montaje, monitoreo y control humedad, temperatura, biomasa y CO <sub>2</sub> . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O <sub>2</sub> , dificultad en la toma de muestra y problemas en la eliminación de calor.
Tambor rotatorio	Mayor aireación y mezclado del sustrato. Existen varios diseños con modificaciones que mejoran la remoción del calor	Daño de estructura micelial. Dificultad en el control de temperatura y humedad. Poco volumen utilizado en el tambor
Tanque horizontal con paletas de mezclado	Menor tiempo de residencia. Mejor mezclado y crecimiento fúngico. Mayor asepsia.	Transferencia no homogénea de calor. Aglomeración de células por rompimiento micelial
Lecho fluidizado	Operación de forma continua. Menor aglomeración del sustrato. Incremento en la transferencia de O <sub>2</sub> y humedad.	Formación de altos esfuerzos cortantes que pueden afectar al microorganismos y rendimiento del producto

### 1.5. Modelamiento de biorreactores de charola

La importancia del modelamiento y la simulación en el diseño y optimización de procesos se conoce bien y está ampliamente reportado (Chen, 2013; Jou y col. 2011; Lian y col. 2012). Debido a que los procesos biotecnológicos han ido convirtiéndose en procesos

bastante viables en la obtención de compuestos biológicamente activos y/o de interés industrial obteniéndose así un beneficio económico (Castañeda y col. 2012), el modelamiento de éstos es una herramienta indispensable para su desarrollo y optimización (Jara y col. 2001). Los puntos que se presentan a continuación son sobre los biorreactores de charolas.

### **1.5.1. Balances de masa y energía**

En el desarrollo de modelos matemáticos de los biorreactores, se deben considerar los efectos del cambio de la temperatura, el cambio de las características del medio de cultivo (pH, concentración de nutrientes, etc.) en la biorreacción, sin embargo, la mayoría de los modelos reportados en la literatura ignoran esto (Jara y col. 2001). Los balances de masa y energía son esenciales en el desarrollo de un modelo de un biorreactor. No obstante debido a que los procesos bioquímicos operan, por lo general, en condiciones isotérmicas, el balance de energía no es necesario. Por lo tanto con el balance de masa es suficiente para modelar el comportamiento del biorreactor.

En el caso que la temperatura juegue un papel esencial en el comportamiento del biorreactor. Los modelos deben considerar el balance energético (Sahir y col. 2007). En cuanto al balance de masa, existen modelos que consideran la transferencia de oxígeno (Rajagopalan y col. 1995) y otros, incluso el balance de agua (Weber y col. 2002). Ragheva y col. (1993) desarrollaron un modelo empírico, que considera un estado pseudo-estacionario para la difusión de  $O_2$  en el interior del lecho de un biorreactor de charola. Este modelo empírico es una ecuación algebraica que predice el perfil de concentración de  $O_2$  en función de la altura dentro de la cama. El modelo de Weber y col. (1999) considera el balance de energía y el balance de agua, lo que permite describir el comportamiento de la humedad del cultivo durante la fermentación. Mendoza y col. (2004) proponen una modificación al modelo Weber y col. (1999) incorporando la cinética de crecimiento de los microorganismos. Los modelos más recientes de balance para describir el proceso de FMS incluye los balances de masa y energía y ecuaciones cinéticas (Ali y col. 2009) considerando los términos generación de calor metabólico, convección y evaporación de agua. Ricardo y col. (2012) plantean el balance a partir del modelo pseudo-homogéneo en un biorreactor de lecho fijo a escala industrial. Von Meien y Mitchell (2002), Figueroa-Montero (2011) desarrollaron un modelo de dos fases para la transferencia de agua y

energía dentro de un biorreactor para fermentación en medio sólido de mezclado intermitente con aireación forzada.

### 1.5.1.1. Balances de calor

La transferencia de calor se identifica como un mecanismo esencial para diseñar los biorreactores de charola, tanto por estudios experimentales (Fanaei y col. 2009; Mendoza y col. 2004; Rajagopalan y col., 1994) como de modelamiento (Chen, 2013; Lian y col. 2002).

Szewczyk (1993) modeló el efecto de la transferencia de calor en la biorreacción, considerando mecanismos convectivos y evaporativos. En este modelo se considera 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 aumenta al incrementar el flujo de aire que pasa sobre la superficie de la charola.

Rajagopalan y col. (1994, 1995), propusieron un balance de calor que toma en cuenta la conducción y la producción de calor metabólico. El modelo de transferencia de calor lo expresaron de la siguiente forma (Ec. 1.1):

$$\rho_s C p_s \frac{\partial T}{\partial t} = k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q \quad Ec. 1.1$$

Donde  $\rho_s$ ,  $C p_s$ ,  $T$  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 al modelo de Rajagopalan y col. (1994, 1995) para describir la remoción de calor por evaporación (Ec. 1.2):

$$\rho_s C p_s \frac{\partial T}{\partial t} = k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q + \lambda D_{VAP}^* \frac{\partial^2 C_{VAP}}{\partial z^2} \quad Ec. 1.2$$

Dónde  $\lambda$  es 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. Smits y col. (1999) demostraron que la contribución de la evaporación al enfriamiento puede despreciarse si las charolas son incubadas en un ambiente con una humedad relativa del 98%. Sin embargo, en sistemas con aeración forzada la evaporación contribuye de manera importante al enfriamiento. Ya que el aire saturado al calentarse debido al calor metabólico aumenta su capacidad de retener agua y ésta al evaporarse toma calor del medio sólido.

### 1.5.1.2. Balances de oxígeno

Las ecuaciones de balance de  $O_2$  en el lecho consideran la difusión de  $O_2$  dentro de los poros y el consumo por el microorganismo. Sin embargo, debido a las diferentes formas en que se visualizó el sistema, las ecuaciones aparecen de forma ligeramente diferente. La ecuación utilizada por Smits y col. (1999) para describir el balance de  $O_2$  dentro del lecho es (Ec. 1.3):

$$\frac{\partial C_{O_2}^b}{\partial t} = D_{O_2}^b \frac{\partial^2 C_{O_2}^b}{\partial z^2} - r_{O_2} \quad Ec. 1.3$$

Donde  $t$  es el tiempo,  $C_{O_2}^b$  la concentración de  $O_2$  por unidad de volumen de lecho,  $z$  la coordenada vertical y  $r_{O_2}$  es la tasa de consumo de  $O_2$  por el microorganismo. El primer término del lado derecho describe la difusión de  $O_2$  en los poros, la difusividad  $D_{O_2}^b$  corresponde a una difusividad efectiva que explica el hecho de que los poros representan sólo una parte del volumen total del lecho y proporcionan un trayecto tortuoso para la difusión.

El modelo de Rajagopalan y col. (1995) reconoce la existencia de una biopelícula de biomasa que cubre las partículas en el lecho. En este caso, la ecuación para la transferencia de  $O_2$  en los poros del lecho es (Ec. 1.4):

$$\varepsilon \frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} = D_{O_2}^b \frac{\partial^2 C_{O_2}}{\partial z^2} - K_a a_x (C_{O_2} - HC_{O_2}^f) \quad Ec. 1.4$$

Donde  $C_{O_2}$  es la concentración de  $O_2$  en los poros,  $\varepsilon$  la porosidad del lecho,  $K_a$  el coeficiente de transferencia de masa para el  $O_2$  en la interface aire/biopelícula,  $a_x$  el área de la interface aire/biopelícula por unidad de volumen del biorreactor,  $H$  la constante de la ley de Henry y  $C_{O_2}^f$ , la concentración de  $O_2$  en la biopelícula. Otra ecuación es requerida para describir el consumo de  $O_2$  por la biomasa. Una aproximación al estado pseudo-estacionario fue utilizada para describir la tasa de transferencia de  $O_2$  en la biopelícula (Ec. 1.5):

$$\frac{\partial C_{O_2}^f}{\partial t} = 0 = K_a a_x (C_{O_2} - H C_{O_2}^f) - r_{O_2} \quad \text{Ec. 1.5}$$

Esto implica que la concentración de  $O_2$  ( $C_{O_2}^f$ ) en la biopelícula sea supuesta para ajustar de tal manera que la tasa de transferencia de  $O_2$  sea igual a la tasa de consumo de  $O_2$ , que se supone que depende de la concentración de  $O_2$  de acuerdo con la cinética de Monod. En este modelo, el cambio en la concentración de gas a medida que fluye en el espacio de cabeza a través de la superficie del lecho también fue modelado (Ec. 1.6).

$$\frac{\partial C_{O_2}^X}{\partial t} = -v_x \frac{\partial C_{O_2}^X}{\partial x} - \frac{D_{O_2}^b}{zh} \frac{\partial D_{O_2}}{\partial x} \Big|_{y=L} \quad \text{Ec. 1.6}$$

Donde  $C_{O_2}^X$  es la concentración de  $O_2$  en el espacio de cabeza,  $x$  la coordenada horizontal en el espacio de cabeza,  $L$  la altura del lecho y  $zh$  la altura del espacio de cabeza. El primer término del lado derecho describe la convección en el espacio de cabeza a través de la superficie de la lecho y el segundo término describe la transferencia de  $O_2$  del espacio de cabeza hacia el lecho.

### 1.5.2. Dinámica de Fluidos Computacionales

El modelamiento en ingeniería es una herramienta esencial tanto para el diseño y/o optimización de nuevos procesos, como para el entendimiento de los fenómenos de

transporte y cinéticos presentes en el sistema. El modelado es una herramienta práctica para evaluar propuestas de diseños de sistemas biológicos, ya que permite por un lado entender los mecanismos de transporte de momento y por otro su efecto local en los de transporte de masa (Heniche y col. 2008). Por lo anterior diferentes áreas del conocimiento como la reología, ingeniería mecánica, bioquímica, química, hacen uso del modelado como herramienta básica de diseño, (Krasnopolskaya y col. 1999). El modelado a nivel local de los diferentes fenómenos de transporte se basa en las aportaciones numéricas de John Von Neumann (1903- 1957), quien estudió la estabilidad numérica en sistemas dinámicos (Krasnopolskaya y col. 1999). Por otro lado, Clough (1960) propuso el uso de un método numérico llamado elementos finitos, el cual es utilizado actualmente en la mayoría de los simuladores, con aplicación en el análisis estructural (Donea, 1992) y que se extendió al estudio de la mecánica de fluidos (Heniche y col. 2008).

En los años 80, se desarrollaron aportaciones en la propuesta de métodos numéricos que abordan problemas complejos en dos dimensiones principalmente, y se limitaron a la solución de sistemas en tres dimensiones. El avance de esquemas numéricos con soluciones iterativas Krylov, y la tecnología computacional en los últimos 20 años es lo que hace posible la solución de sistemas tridimensionales con geometrías similares a las experimentales, dando lugar a un nuevo paradigma que se refiere al diseño en modelado de sistemas complejos a nivel local (Heniche y col. 2008).

Actualmente la dinámica de fluidos computacionales (CFD) es una herramienta que se utiliza para la simulación de procesos, estimación de parámetros de transporte y cinéticos, así como para determinar las condiciones de operación. COMSOL Multiphysics® es un software comercial que es utilizado como interfase para resolver sistemas complejos utilizando la teoría de CFD. Este software maneja módulos relacionados con diferentes áreas de ingeniería. Un módulo es el de Ingeniería Química, que es un paquete que ofrece una interfase para modelar fenómenos de transporte de momento, calor y masa, con y sin reacción en una gran cantidad de sistemas. Por ejemplo, con respecto al estudio hidrodinámico, se generan interfases que permiten modelar un sistema considerando un flujo laminar o un flujo turbulento. La solución de los modelos se basa en el método de elementos finitos. La notación del módulo de ingeniería química relacionado a los fenómenos de transporte se basa en libros de fundamentos como el libro Fenómenos de transporte (Bird y col. 2010); mientras que en el ámbito de la ingeniería de las reacciones químicas se basa en libros de ingeniería de las reacciones como el libro Elementos de

ingeniería de las reacciones (Fogler, 2001). El enfoque CFD es una herramienta que permite describir el comportamiento hidrodinámico del fluido así como entender su efecto en los distintos mecanismos cinéticos y de transferencia de calor y masa. Partiendo de esta idea, Chen (2013) modeló mediante simulación numérica utilizando el software COMSOL Multiphysics una FMS en un biorreactor de charola la producción de celulasas por *P. decumbens* bajo diferentes modos de operación del sistema y el efecto en las variables de respuesta. Jou y col. (2011) utilizaron el enfoque CFD para simular el transporte de calor y momento en un biorreactor de charolas así como la estimación de calor metabólico producido por *T. virens* durante el proceso de FMS. Lian y col. (2002) desarrollaron un modelo de CFD para simular la transferencia de calor y la oxidación enzimática de polifenoles en un lecho empacado durante la fermentación del té negro.

## 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### **Justificación**

La generación de subproductos orgánicos ha motivado la búsqueda de alternativas para su valorización. Las propiedades de estos materiales hacen que los procesos convencionales para su aprovechamiento sean costosos y/o contaminantes. Debido a las características de proceso, la fermentación en medio sólido ofrece una alternativa atractiva para la recuperación de compuestos con mayor valor agregado. Sin embargo, es necesario profundizar en el entendimiento del efecto de las variables del proceso en el comportamiento de esta clase de biorreactores.

### **Hipótesis**

El diseño, construcción y operación de un prototipo simplificado de un reactor de charola y su modelado permite caracterizar y entender el efecto de las variables de operación durante un proceso de fermentación en medio sólido.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Diseñar y caracterizar un biorreactor de charolas a escala de banco para evaluar los distintos mecanismos de transporte en un proceso de fermentación sólida utilizando subproductos de frutas y verduras como soporte.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Diseñar, construir y poner a punto un biorreactor de charolas a escala de banco.
2. Evaluar los mecanismos de transferencia de masa por dispersión en condiciones abióticas.
3. Evaluar los mecanismos convectivos y conductivos de transferencia de calor en condiciones abióticas.
4. Evaluar el comportamiento del biorreactor en condiciones bióticas.
5. Modelar mediante CFD el biorreactor en condiciones bióticas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Diseño y construcción del biorreactor de charolas**

Se diseñó un biorreactor de charolas a escala de banco. Esta escala se orienta a la configuración del biorreactor con características geométricas y operacionales similares a los equipos de planta piloto o industriales, a diferencia de la escala de laboratorio, donde el equipamiento utilizado difiere considerablemente del industrial.

El diseño se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- Dimensiones de la charola
- Cantidad de soporte/sustrato
- Presión del sistema
- Temperatura máxima de operación
- Aireación del sistema
- Instrumentación

#### **4.1.1. Material**

Al considerar los parámetros de diseño, en específico la presión del sistema y la temperatura máxima de operación se optó por diseñar un modelo en frío del biorreactor de charolas en acrílico. Las propiedades de dicho material se presentan en la Tabla 4.1.

**Tabla 8.1.** Propiedades del acrílico (Bill, 1999)

PROPIEDADES	VALOR
ÓPTICAS	
• Transparencia	93%
MECÁNICAS	
• Alta resistencia al impacto (CHARPY)	20-30 kg.cm/cm <sup>2</sup>
• Densidad	1190 kg/m <sup>3</sup>
• Alta dureza	50-52
TÉRMICAS	
• Punto de ablandamiento	120-124 °C
• Punto de inflamación	280 °C

#### 4.1.2. Geometría del biorreactor

El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en lo menor posible en los bioprocesos de larga duración así como permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y disponibilidad de nutrientes para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos, disponer de puertos de muestreo que faciliten la adaptación de sistema de medición en medida que afecten en lo menor posible al bioproceso.

La geometría del biorreactor se diseñó tomando la forma de un recipiente rectangular con un volumen de 4.5 L. El biorreactor consta de dos módulos que se acoplan mediante tornillos de acero inoxidable; de la misma manera se integra la tapa superior del sistema.

#### 4.1.3. Cierre hermético

Se le denomina *junta* al anillo toroidal tipo *O-ring*, este por lo regular se emplea sellando uniones en bridas. Su función principal es asegurar la estanqueidad de fluidos, por lo general se encuentra en equipos para impedir el intercambio de líquidos o gases en las uniones entre piezas desmontables. Existen diversos tipos de juntas dependiendo de su

aplicación o según el material del que está constituido. En ese caso, se observa principalmente la presión y temperatura de trabajo a la cual será sometida. Habitualmente son de goma pues se fabrican de diferentes materiales como la buna, teflón o algún elastómero como el neopreno, polímeros o viton.

Mediante la inclusión de juntas de neopreno entre los módulos que componen al biorreactor y en la tapa superior permitió un sellado óptimo que evitó caídas de presión.

#### **4.1.4. Charola**

El diseño de la charola debe ser tal que la superficie facilite la disposición del lecho empacado y a su vez permita el crecimiento y mantenimiento del cultivo uniformemente distribuido. En sistemas de aireación forzada se emplean charolas perforadas que facilitan el libre paso de aire a través del lecho empacado.

La charola consiste en una superficie plana rectangular de 300 cm<sup>2</sup> (15 x 20 cm) elaborada de malla de acero inoxidable T-304 con un número de malla de 40 que permitió el flujo de aireación a través del lecho.

#### **4.1.5. Difusor de aire**

Estos sistemas de aireación fijos garantizan una transferencia eficiente de oxígeno en los procesos biológicos. Todos los sistemas de aireación son soluciones de diseño completas cuyo objetivo es adaptarse a la demanda de oxígeno y al tamaño y la geometría del depósito existentes en aplicaciones específicas.

El diseño del difusor de aire tipo serpentín consistió en un tubo de acero inoxidable T-304 de ¼ de pulgada de diámetro y perforaciones de 1 mm de diámetro para permitir el paso de aire a través del tubo.

#### **4.1.6. Humidificación de aire**

El contenido de humedad del aire es fundamental para la supervivencia y metabolismo de los microorganismos. Las estrategias para asegurar un porcentaje de humedad adecuado consisten en humidificar el aire de entrada al biorreactor. Generalmente el aire de entrada debe tener una humedad relativa superior al 95%.

Para saturar el aire con agua se hizo pasar un flujo de aire a través de un humidificador de vidrio sinterizado. Este flujo de aire saturado fue medido con un rotámetro (AALBORG) con capacidad máxima de 1000 mL/min.

#### **4.1.7. Instrumentación**

Se distribuyeron estratégicamente diferentes puertos de muestreo en la superficie del biorreactor para permitir la toma de datos durante pruebas experimentales, los puertos se acoplaron al tamaño los sensores específicos para cada tipo de medición. Se utilizó un sensor de temperatura de acero inoxidable (Vernier®), para las mediciones de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y humedad relativa se utilizaron sensores marca Vernier®. El registro en línea de los datos de cada sensor se realizó mediante la interfaz LabPro® (Vernier®).

#### **4.1.8. Sistema de calentamiento**

El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada a través de sistemas de calefacción.

El sistema de calentamiento-enfriamiento consistió de un recipiente rectangular de acrílico de ½ pulgada con capacidad de 51.8 L en donde se sumergió el biorreactor en agua destilada. La adaptación de un termo-recirculador (LAUDA) permitió regular la temperatura del sistema de calentamiento.

#### 4.1.9. Cámara de gases

La medición en línea de gas CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y de humedad relativa requirió del diseño de una cámara hermética independiente al diseño del biorreactor en donde se pudiesen acoplar los sensores específicos para cada medición. La cámara de gases se construyó con placas de acrílico de ½ pulgada de espesor y un volumen de 1.2 L.

#### 4.2. Operación del biorreactor

La operación del biorreactor de charolas se realizó en dos etapas. La primera consideró un sistema abiótico y la segunda un sistema biótico que consistió en una fermentación en medio sólido (FMS).

##### 4.2.1. Hermeticidad

La primera prueba abiótica realizada al sistema se refiere a la capacidad de hermetismo del mismo que se probó mediante la observación de caídas de presión. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. Se suministró un flujo de aireación al biorreactor
2. Se cerraron las válvulas de salida de gases del sistema para presurizarlo
3. Se canceló el flujo de aireación y se cierra la válvula de entrada
4. Por último se registró la presión en el sistema cada 10 min durante 1 h.

En la Tabla 4.2 se muestran las propiedades físicas de juntas tipo *o-ring* de neopreno probadas en este estudio con el objetivo de encontrar la que permitiera la hermeticidad del biorreactor. En particular la junta de geometría circular es más densa que la de geometría rectangular.

**Tabla 4.2.** Propiedades físicas de las juntas tipo *o-ring* de neopreno (Childs, 2014)

	<b>Espuma de neopreno</b>	<b>Cordón de neopreno</b>
<b>Geometría</b>	Rectangular	Circular
<b>Temperatura de operación</b>	-40 a 93 °C	-20 a 105 °C
<b>Densidad</b>	0.9 g/cm <sup>3</sup>	1.45 g/cm <sup>3</sup>
<b>Espesor</b>	6.35 mm	4.7 mm

#### 4.2.2. Medio poroso

El medio poroso para empacar el reactor de charola estuvo constituido por una mezcla que contenía 46.7 % de subproductos de frutas y verduras y un 53.3 % de pasta de soya, en donde los subproductos de frutas y verduras se sometieron a un proceso de deshidratación y homogenización de tamaño de partícula para poder ser utilizados como componente del medio poroso, dicho proceso se describe a continuación:

1. Se colectaron subproductos frescos de frutas y verduras de diversas fuentes de los alrededores la universidad (UAM-I).
2. Posteriormente se deshidrataron los subproductos frescos por medio de la aplicación de un flujo de aire a 60 °C en un secador tipo charola de 10 Kg de capacidad durante 12-15 horas.
3. La materia seca se trituró en porciones de 300 a 400 g en una licuadora de uso doméstico en periodos de 30 s con el objetivo de reducir el tamaño de partícula.
4. Por último se la materia seca se tamizó y separó en porciones según el tamaño de partícula de acuerdo a la siguiente tabla:

<b>No. Malla</b>	<b>Tamaño de partícula TP (mm)</b>
<b>12-14</b>	1.68 > TP > 1.41
<b>14-20</b>	1.41 > TP > 0.84
<b>20-30</b>	0.84 > TP > 0.595
<b>30-40</b>	0.595 > TP > 0.42
<b>40-60</b>	0.42 > TP > 0.25
<b>60</b>	0.25 > TP

#### 4.2.2.1. Composición elemental del medio poroso

Composición elemental *CHN* en por ciento de los materiales que constituyen el medio poroso

Elemento	Frutas y verduras	Pasta de soya
<b>C</b>	66.72	44.2
<b>H</b>	11.58	6.83
<b>N</b>	2.8	7.43

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 col. 1971), se determinó la composición elemental basada en carbono para los subproductos de frutas y verduras  $\text{CH}_{2.08}\text{O}_{0.82}\text{N}_{0.035}$  y para la pasta de soya  $\text{CH}_{1.85}\text{O}_{0.75}\text{N}_{0.144}$ . En la Tabla 4.3 se muestra la composición en por ciento de los componentes medio poroso (Reyes y col. 2015).

**Tabla 4.3.** Composición de los componentes del medio poroso

Componente	Frutas y verduras	Pasta de soya
<b>Humedad (%)</b>	5.09	6.91
<b>Proteínas (%)</b>	7.43	34.56
<b>Carbohidratos (%)</b>	73.04	52.01
<b>Grasa (%)</b>	2.02	1.36
<b>Fibra (%)</b>	11.13	5.3
<b>Ceniza (%)</b>	6.38	6.77

A partir de los datos mostrados en la Tabla 4.3 se determinó la composición elemental del medio poroso basada en carbono  $\text{CH}_{1.87}\text{O}_{0.7}\text{N}_{0.0913}$ .



### 4.2.3. Cálculo de propiedades físicas y termodinámicas del medio poroso

Algunas propiedades físicas para el medio poroso fueron estimadas a fin de facilitar su uso en cálculos y procedimientos.

#### 4.2.3.1. Densidad real de sólido

La densidad real de los componentes del medio poroso 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) pueden ser calculadas con las siguientes ecuaciones (Toledo, 1994; Figueroa-Montero, 2011):

$$\rho_w = 997.18 + 0.0031439 T - 0.0037574 T^2$$

$$\rho_p = 1329.9 - 0.51814 T$$

$$\rho_f = 925.59 - 0.41757 T$$

$$\rho_c = 1599.1 - 0.31046 T$$

$$\rho_{fi} = 1311.5 - 0.36589 T$$

$$\rho_a = 2423.8 - 0.28063 T$$

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 real de sólido, se calcula con la siguiente ecuación (Toledo, 1994; Figueroa-Montero, 2011):

$$\rho_{bs} = \frac{1}{\sum X_i / \rho_i} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Dónde  $\rho_b$  es la densidad real de sólido,  $X_i$  es la fracción másica de cada componente y  $\rho_i$  la densidad individual de cada componente.

#### 4.2.3.2. Conductividad térmica del medio poroso

Se aplicó el procedimiento propuesto por Choi y col. (1987), el cual permite calcular 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 col. 1987; Figueroa-Montero, 2011):

$$k_b = \sum (k_i X_{vi}) \quad \text{Ec. 4.2}$$

Los valores de conductividad en  $\text{W}\cdot(\text{m}\cdot\text{K})^{-1}$  son calculados a la temperatura ( $T$ ) en  $^{\circ}\text{C}$  que se esté considerando con las ecuaciones siguientes (Choi y col. 1987, Figueroa-Montero, 2011):

$$k_w = 0.57109 + 0.0017625 T - 6.7306 \times 10^{-6} T^2$$

$$k_p = 2.2196 + 0.0062489 T + 1.0154 \times 10^{-4} T^2$$

$$k_f = 0.1807 + 0.0027604 T - 1.7749 \times 10^{-7} T^2$$

$$k_c = 0.2014 + 0.0013874 T - 4.3312 \times 10^{-6} T^2$$

$$k_{fi} = 0.18331 + 0.0012497 T - 63.1683 \times 10^{-6} T^2$$

$$k_a = 0.3296 + 0.001401 T - 2.9039 \times 10^{-6} T^2$$

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

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

$$X_{vi} = \frac{X_i \rho_{bs}}{\rho_i} \quad \text{Ec. 4.3}$$

#### 4.2.3.3. Conductividad térmica del medio poroso

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

$$X_{vb} = \frac{X_b \rho_{ap}}{\rho_{bs}} \quad Ec. 4.4$$

Donde  $X_b$  es la fracción másica del medio poroso,  $\rho_{ap}$  y  $\rho_{bs}$  son las densidades aparente y real. La fracción volumétrica de aire  $X_{va}$  se calculó por diferencia mediante la siguiente ecuación:

$$X_{va} = 1 - X_{vb} \quad Ec. 4.5$$

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 ecuación:

$$k_{ap} = k_a X_{av} + k_{bs} X_{bv} \quad Ec. 4.6$$

#### 4.2.3.4. 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 col. 1993; Figueroa-Montero, 2011) y puede ser calculada mediante la siguiente ecuación

$$Cp = 1.42mc + 1.549mp + 1.675mf + 0.837ma + 4.187mw \quad Ec. 4.7$$

Donde,  $mc$ ,  $mf$ ,  $ma$  y  $mw$  son las fracciones másicas individuales de carbohidratos (c), proteínas (p), grasas (f), cenizas (a) y agua (w).

#### 4.2.3.5. Propiedades físicas y termodinámicas del medio poroso

Al considerar los métodos de cálculo mencionados anteriormente y la composición del medio poroso empleado indicado en el capítulo 4.2.2.1, se presenta en la Tabla 4.4 los valores de las propiedades físicas y termodinámicas estimadas. El valor calculado para la conductividad térmica del medio poroso ( $k$ ) en el presente trabajo fue de 0.158 W/m K. Casciatori y col. (2013), reportaron un valor de  $k$  de 0.158 W/m K para residuos de naranja con 6 % de humedad. Figueroa-Montero (2011) reportó un valor de  $k$  de 0.158 W/m K para un lecho compuesto por salvado de trigo y harina de soya. Por otro lado, el valor obtenido para la capacidad calorífica ( $C_p$ ) en este trabajo fue de 1.84 J/g K. Hwang, (2003) reporta un valor de  $C_p$  para subproductos de frutas de 0.8374 J/g K, así mismo presentan una ecuación para calcular el valor de  $C_p$  para harina de soya a partir de la fracción de agua mediante la cual obtuvieron un valor de 1.84 J/g K. Por lo que el valor calculado para el  $C_p$  en este trabajo coincide con lo reportado por otros trabajos. Rahman (1995) reportó un valor de 2.09 J/g K para el  $C_p$  de subproductos de frutas con una fracción másica de agua de 0.3 y un valor en el rango 1.79–1.88 J/g K para el  $C_p$  de harinas con una fracción másica de agua de entre 0.12 a 0.135.

**Tabla 4.4.** Propiedades físicas y termodinámicas del medio poroso

Propiedad	Valor
Densidad aparente $\rho_{app}$ ( $kg/m^3$ )	660
Densidad real $\rho_{bs}$ ( $kg/m^3$ )	1381.21
Conductividad térmica $k$ ( $W/m \cdot K$ )	0.158
Capacidad calorífica $C_{p_b}$ ( $J/g \cdot K$ )	1.84

En la Tabla 4.5 se muestran los parámetros de operación del biorreactor para los estudios abióticos. Se emplearon tres flujos de aireación con el objetivo de determinar el efecto en la hidrodinámica del sistema así como en la transferencia de calor y masa en ausencia de los microorganismos manteniéndose fijos los demás parámetros presentados en la Tabla 4.5. En procesos de FMS se reporta el uso de materiales con tamaño de partícula de 1 a 10 mm (Manpreet y col. 2005), por lo que se homogenizó a un  $1.68 > TP > 1.41$  (malla 12-14). El medio poroso se ajustó a una humedad del 60 % con agua destilada y se empacó

la charola a una densidad de empaque uniforme de  $0.66 \text{ g/cm}^3$  evitando el apelmazamiento del medio poroso. La fracción vacía del lecho se calculó mediante el cociente del volumen del lecho empacado antes de la compactación entre el volumen del lecho compactado.

**Tabla 4.5.** Parámetros de operación en estudios abióticos

Parámetro	Magnitud
Composición del medio poroso	53.3 % pasta soya, 43.7 % frutas y verduras
Temperatura de sistema de calentamiento	45 °C
Flujo de aireación (aire saturado)	200, 300, 400 mL/min
Altura del lecho empacado	2 cm
Densidad del lecho empacado	$0.66 \text{ g/cm}^3$
Masa del lecho empacado (húmedo)	400 g
Humedad del lecho empacado	60 %
Tamaño de partícula del lecho empacado	<1.68 a >1.41 mm (diámetro)
Fracción vacía del lecho empacado	0.4

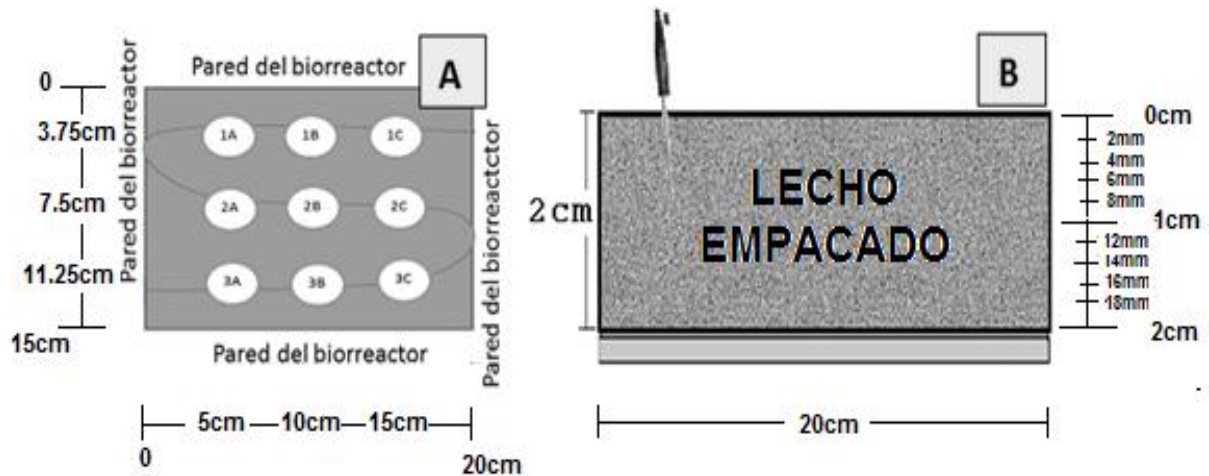
#### 4.2.4. Transferencia de calor

Este estudio consistió en generar los gradientes de temperatura en dirección axial y radial en el lecho empacado. Se verificó la transferencia de calor por convección al suministrar al sistema un flujo de aire frío ( $\approx 20 \text{ °C}$ ), y se consideraron los parámetros de operación que se muestran en la Tabla 4.5

El procedimiento para realizar el estudio de transferencia de calor es el siguiente:

1. Antes de cada prueba, es importante comprobar la hermeticidad en el sistema.
2. Se precalentó el baño de agua a  $45 \text{ °C}$ .
3. Se ajustó la humedad del medio poroso al 60 % con agua destilada.
4. Se empacó la charola con la masa húmeda a una misma densidad de empaque en toda la superficie.
5. Se acomodaron los sensores de temperatura en la tapa superior del biorreactor de acuerdo a la Figura 4.1 A.

6. Se suministró el flujo de aireación (aire frío  $\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
7. Se sumergió el biorreactor en el baño de agua durante 2.5 h a que se llegó al estado estacionario de temperatura en el espacio de cabeza del biorreactor.
8. Se registró la temperatura a diferentes alturas del lecho en las zonas del biorreactor según la Fig. 4.1 (A) y (B).



**Figura. 4.1.** (A) Distribución de las zonas en el biorreactor (vista superior); (B) Registro de temperatura a diferentes alturas del lecho

#### 4.2.5. Transferencia de oxígeno

El estudio del transporte de oxígeno se realizó empleando el modelo de dispersión axial el cual es útil para representar el flujo en recipientes reales y para identificar interferencias en el flujo.

##### 4.2.5.1. Distribución de Tiempos de Residencia (DTR)

La determinación del grado de dispersión en lechos empacados se realiza mediante el método de estímulo-respuesta, técnica muy adecuada que emplea un trazador para conocer el tiempo que permanece cada elemento de fluido en el medio poroso, es decir, la distribución de tiempos de residencia (DTR) necesaria y suficiente para caracterizar la hidrodinámica del biorreactor.

La señal pulso, consiste en inyectar un volumen de 200 mL de oxígeno (trazador) a la corriente de alimentación de forma instantánea, de tal manera que se aprecie un pico de concentración de oxígeno en un gráfico de concentración vs tiempo (Bahl y col. 2012).

Pueden emplearse diferentes tipos de modelos para caracterizar los tipos de flujo no ideal en los recipientes, un ejemplo son los modelos de dispersión que explican las desviaciones de los sistemas reales respecto al flujo pistón (caso de los reactores tubulares y los lechos empacados).

El coeficiente de dispersión  $D$  ( $m^2/s$ ) caracteriza el proceso de dispersión. Así:

- Un valor grande de  $D$  indica que el mecanismo de transferencia de masa por dispersión es dominante.
- Un valor pequeño de  $D$  indica que el mecanismo de transferencia de masa por dispersión no es dominante.
- $D=0$  indica que no hay dispersión.

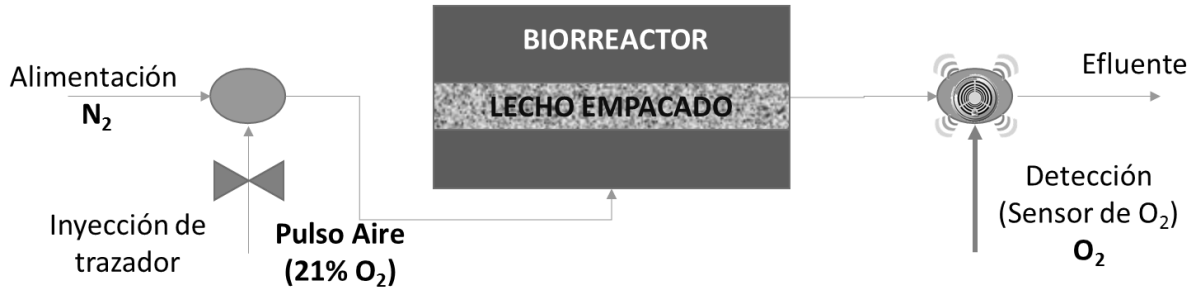
Asimismo,

$D/uL$  o *coeficiente de dispersión* es el grupo adimensional que caracteriza a la dispersión en todo el sistema.

El procedimiento realizado para dicho estudio es el siguiente (Levenspiel, 2004):

1. Se realizó la prueba de hermeticidad.
2. Se empacó la charola.
3. Se instaló el sensor de gas  $O_2$  en el efluente de gases del biorreactor.
4. Se suministró una corriente de gas  $N_2$  hasta desplazar por completo el oxígeno dentro del biorreactor.
5. Posteriormente se hizo pasar un volumen conocido de aire (21 %  $O_2$ ) manteniendo constante el flujo de gas  $N_2$ .
6. Por último se registró mediante captura automática los datos correspondientes a la concentración de oxígeno.

La Figura 4.2 representa el procedimiento antes mencionado para la determinación de DTR. La alimentación continua de gas nitrógeno y la inyección del pulso de aire se realizaron mediante un conector tipo “Y” que une los dos flujos de alimentación en un solo punto y se instaló el sensor de gas O<sub>2</sub> en el efluente de salida de gases del biorreactor para la detección continua de concentración de gas O<sub>2</sub>.



**Figura 4.2.** Esquematización del método de inyección de trazador (aire)

#### 4.2.5.2. Cálculo del coeficiente de dispersión axial (D)

Se calcula  $D$  o  $D/uL$  registrando la forma de la curva del trazador conforme pasa por la salida del sistema. En particular, se calcula:

$\bar{t}$  = tiempo medio de tránsito, o cuando la curva pasa por la salida.

$\sigma^2$  = varianza, o una medida de la dispersión de la curva.

Estas medidas,  $\bar{t}$  y  $\sigma^2$ , están directamente relacionadas por la teoría con  $D$  y  $D/uL$ . La media, para datos discretos o continuos, se define como:

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} tC dt}{\int_0^{\infty} C dt} = \frac{\sum t_i C_i \Delta t_i}{\sum C_i \Delta t_i} = \frac{\sum t_i C_i}{\sum C_i} \quad \text{Ec. 4.9}$$



La varianza se define como

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - \bar{t})^2 C dt}{\int_0^{\infty} C dt} = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C dt}{\int_0^{\infty} C dt} - \bar{t}^2 \quad \text{Ec. 4.10}$$

o en forma discreta

$$\sigma^2 = \frac{\sum t_i^2 C_i}{\sum C_i} - \bar{t}^2 = \frac{\sum t_i^2 C_i}{\sum C_i} - \left[ \frac{\sum t_i C_i}{\sum C_i} \right]^2 \quad \text{Ec. 4.11}$$

La varianza representa el cuadrado de la dispersión de la distribución conforme pasa por la salida del recipiente y tiene unidades de tiempo ( $t^2$ ). Es particularmente útil para ajustar curvas experimentales a una familia de curvas teóricas.

Cuando el grado de dispersión es grande para recipientes abiertos, la concentración de la sustancia trazadora está dada por la siguiente ecuación (Modelo de dispersión):

$$C = \frac{1}{\sqrt{2\pi * \theta * \left(\frac{D}{uL}\right)}} \exp \left[ -\frac{(1 - \theta)^2}{4 * \theta * \left(\frac{D}{uL}\right)} \right] \quad \text{Ec. 4.12}$$

Dónde:

$$\theta = t/\bar{t} \quad \text{Tiempo adimensional}$$

Finalmente se estima  $\left(\frac{D}{uL}\right)$  por la siguiente expresión mediante un procedimiento iterativo.

Que en este trabajo es método de error y tanteo.

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma_t^2}{\bar{t}^2} = 2 \left(\frac{D}{uL}\right) - 2 \left(\frac{D}{uL}\right)^2 [1 - e^{-uL/D}] \quad \text{Ec. 4.13}$$

### **4.3. Sistema biótico**

Esta etapa experimental consistió en evaluar el sistema en condiciones bióticas mediante el montaje de una FMS. En específico, se determinó la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* utilizando como soporte-sustrato los subproductos de frutas y verduras y pasta de soya.

#### **4.3.1. Microorganismo**

Para los estudios bióticos se utilizó la levadura *Yarrowia lipolytica* (Colección de cepas PP4, UAM-I). La cepa empleada es considerada como 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.

#### **4.3.2. Conservación del microorganismo**

Para la propagación de *Y. lipolytica* se partió de un liofilizado de la misma, que se resuspendió con 10 mL de una solución 0.01 % (v/v) de Tween-80. Se inoculó 1 mL de la suspensión celular en matraces Erlenmeyer con agar PDA y se incubaron a 45 °C durante 8 días. Las células nuevas se colectaron agregando una solución 0.01 % (v/v) de Tween-80 y se agitaron con un agitador magnético para desprender las células de la superficie del agar. Para la conservación del microorganismo se mezclaron 500 µL de la solución de células en viales con 500 µL de una solución de glicerol al 30 % (v/v) y chaquiras. La mezcla de conservación se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

#### **4.3.3. Preparación del inóculo**

Se tomaron de 3 a 4 chaquiras de los viales anteriormente mencionados y se colocaron en matraces con agar PDA. Los matraces se incubaron a 45 °C durante 8 días. El cultivo celular se colectó adicionando 3 mL de una solución estéril de Tween-80 al 0.01 % (v/v), se agitó con una barra magnética para recuperar la mayor cantidad de células. Se tomó una alícuota

de 100  $\mu$ l de la suspensión y se diluyó 1:100 con solución de Tween-80 al 0.01 % (v/v) y se contaron las células en una cámara de Neubauer.

#### 4.3.4. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para la FMS para la producción de proteasas (Reyes y col. 2015) se muestra en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Medio de cultivo para FMS

Compuesto	Concentración (g/L)
Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.02
Fosfato de potasio monobásico $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Cloruro de potasio KCl	0.5
Glucosa	30

Para la preparación del medio de cultivo, se disuelven las sales en una solución amortiguadora NaOH- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M, pH 12 y  $\text{CaCl}_2$  5 mM.

#### 4.3.5. Cultivo en el biorreactor de charolas

Se pesaron 160 g de medio poroso (subproductos de frutas y verduras-pasta de soya) y se impregnaron con 240 mL del medio de cultivo previamente inoculado con una solución de  $1 \times 10^7$  cel/g<sub>MS</sub> para una humedad inicial del 60 %. La charola se empaco con 400 g de medio poroso húmedo, ajustando a una altura de 2 cm del lecho empacado. La FMS se realizó a 45 °C durante 36 h, suministrando aire saturado a un flujo de 300 mL/min para favorecer la aireación del lecho y empleando un sistema de recirculación para mantenerla constante.

#### 4.3.6. Monitoreo de la temperatura en el biorreactor

La temperatura se midió con un termopar (Sonda de acero inoxidable, Vernier®) en la zona central y a una altura media del lecho empacado del biorreactor, los valores de temperatura se recopilaron automáticamente cada 5 min mediante la interfaz de adquisición de datos LabPro® y el software LoggerPro® marca Vernier®.

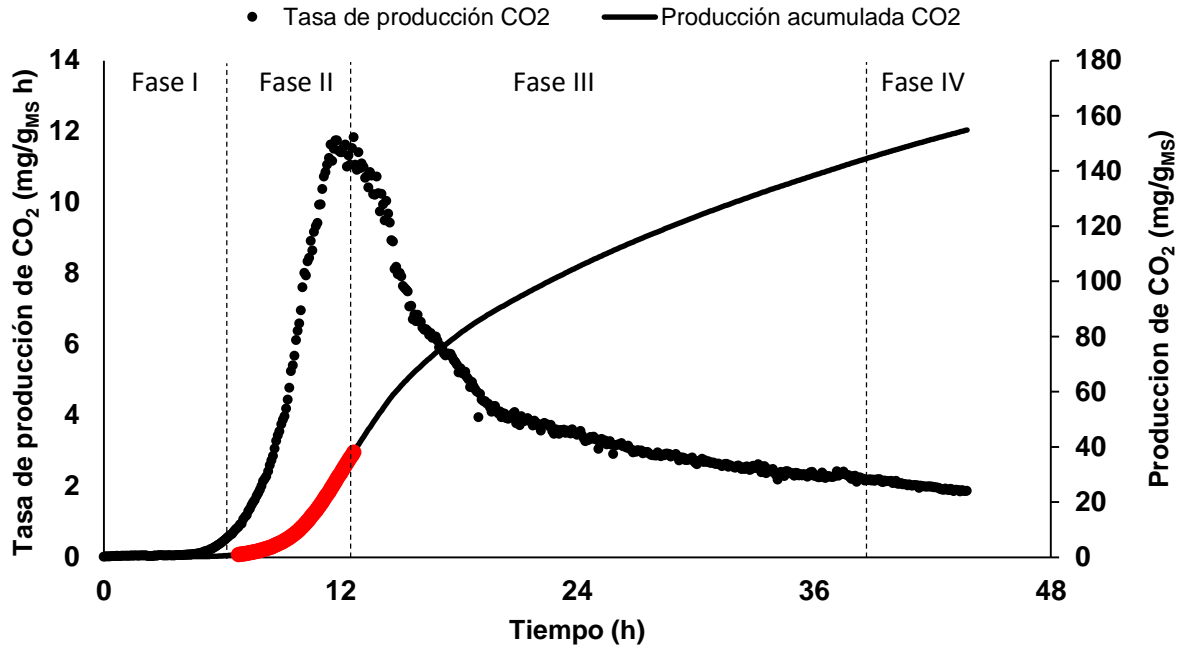
#### 4.4. Métodos analíticos

##### 4.4.1. Respirimetría

Se utilizó la producción de CO<sub>2</sub> como indicador del crecimiento de *Y. lipolytica*. Se suministró el biorreactor de charolas con aire saturado para suministrar el O<sub>2</sub> necesario para la respiración del microorganismo y remover el CO<sub>2</sub>, así como parte del calor metabólico generado por el microorganismo. El efluente de gases del biorreactor se hizo pasar a través de una columna empacada con sílica-gel para deshidratarlo. Finalmente el efluente de gases seco fluyó hacia la cámara de gases en donde se midieron los niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. El sensor de gas de CO<sub>2</sub> (Vernier®) midió los niveles de dióxido de carbono gaseoso en el intervalo de 0 a 1 % (ajuste de rango bajo) o de 0 a 10 % (ajuste de rango alto). El sensor de gas O<sub>2</sub> (Vernier®) midió la concentración de oxígeno en el intervalo de 0 a 27 %. La colección de los datos en línea se llevó a cabo usando la interfase LabPro® y el software LoggerPro® de Vernier. Las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se obtuvieron en por ciento (mL de gas/100 mL de aire).

En la Figura 4.3 se muestra un ejemplo del perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> (rCO<sub>2</sub>) y de la producción acumulada de CO<sub>2</sub> de un cultivo en medio sólido de *Y. lipolytica*. La tasa de producción de CO<sub>2</sub> se modifica durante el periodo de incubación. En las primeras 6 h la rCO<sub>2</sub> presentó un valor cercano a cero. Posteriormente, la rCO<sub>2</sub> aumentó hasta alcanzar su valor máximo a las 12 h aproximadamente. Por último, la rCO<sub>2</sub> decayó hasta permanecer constante cercana a las 39 h de cultivo, aproximadamente.

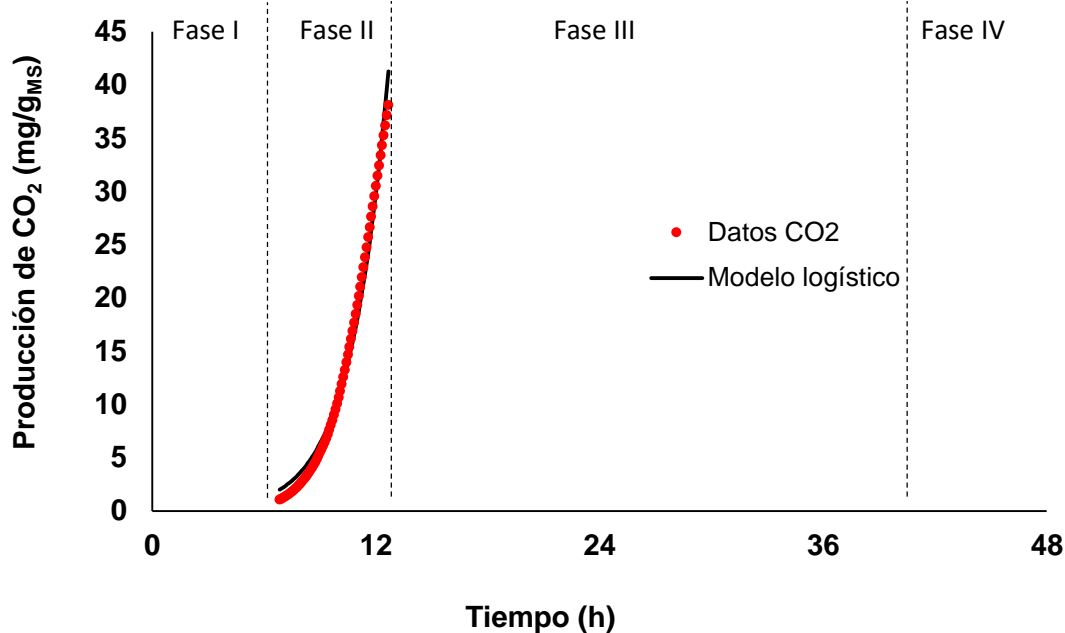
Las tasas de producción se integraron utilizando el método numérico de la regla del trapecio para obtener la producción acumulada de CO<sub>2</sub> (mg/g<sub>MS</sub>). En el perfil de la producción acumulada (Figura 4.3) se distinguen cuatro zonas (señaladas con líneas punteadas).



**Figura 4.3.** Perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y de la producción acumulada de *Y. lipolytica* en cultivo en biorreactor de charolas.

Los datos de producción de CO<sub>2</sub> comprendidos en la segunda etapa (II) se ajustaron con el modelo logístico (Ecuación 5.2) utilizando la función Solver de Excel.

El modelo logístico es simétrico a un punto de inflexión. Por tanto, no puede describir la cinética completa de producción de CO<sub>2</sub>. El ajuste al modelo logístico sin ningún criterio de simetría subestima la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu$ ) en un 20% aproximadamente (Juárez, 2014). En la Figura 4.4 se muestran los datos de producción de CO<sub>2</sub> (etapa II) de *Y. lipolytica* y su ajuste al modelo logístico. Todos los datos en este intervalo presentaron un ajuste adecuado al modelo utilizado ( $R^2 > 0.99$ ).



**Figura 4.4.** Ajuste de la etapa II de los datos de producción de CO<sub>2</sub> de *Y. lipolytica* al modelo logístico

#### 4.4.2. Obtención del extracto enzimático

El extracto enzimático se obtuvo con 20 mL de agua Bonafont® por cada 6 g de masa fermentada. El material fermentado se agitó en un matraz durante 10 minutos y se centrifugó a 7000 rpm por 10 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad proteolítica.

#### 4.4.3. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica en los extractos se determinó acorde a lo reportado por Johnvesly y col. 2001, empleando como sustrato una solución de caseína al 1 % en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 50 mM. Para el ensayo se mezclaron 100 µl del extracto enzimático con 900 µl de solución sustrato. Se preparó un control con 100 µl de extracto enzimático y 900 µl de solución amortiguadora. La reacción se llevó a cabo a 40 °C durante 10 min. Para detener la reacción se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % a

4 °C. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min y se descartó el precipitado. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de papel filtro de poro fino (Per-Filter Grado 615, abertura de poro 8  $\mu\text{m}$ ). Se midió la lectura del filtrado en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800) a 280 nm. Se preparó una solución de tirosina (1 mg/mL) para preparar una curva de calibración. Una unidad de actividad proteasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{g}$  de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo.

#### 4.5. Modelamiento del biorreactor por CFD

Las simulaciones de transporte de momento, calor y masa en el biorreactor se realizaron con CFD usando el software comercial COMSOL® Multiphysics 4.4. Los parámetros involucrados en el modelo fueron obtenidos experimentalmente en el biorreactor de charolas y algunos otros obtenidos de la literatura (Tabla 4.7).

##### 4.5.1. Hidrodinámica

El modelo del reactor está representado por 3 diferentes secciones, 2 de ellas corresponden al fluido y la tercera al lecho empacado:

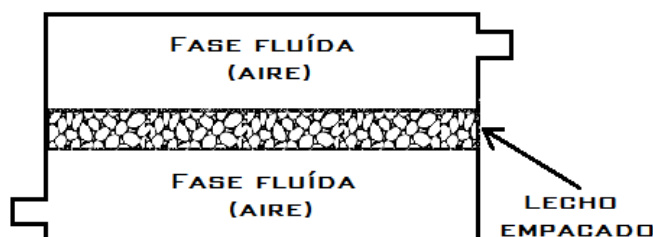


Figura 4.5. Sección transversal del biorreactor

- **Fases fluidas**

Una vez definido el sistema a modelar se deben establecer los modelos necesarios para describir la hidrodinámica de cada sección (2 fases fluidas y un flujo a través de un lecho empacado).

El flujo en las dos fases fluidas se describe a través de la ecuación de continuidad (Ec.4.15) y la ecuación de movimiento (Ec.4.14) considerando que se trata de un fluido newtoniano incompresible con  $\mu$  y  $\rho$  constantes:

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}_f}{\partial t} = -\nabla p + \mu_f \nabla^2 \mathbf{u}_f + \rho_f \mathbf{g} \quad \text{Ec. 4.14}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u}_f = 0 \quad \text{Ec. 4.15}$$

#### ▪ Lecho empacado

Para describir el flujo en el lecho empacado se utilizó la ecuación de Darcy-Brinkman.

$$\frac{\rho}{\epsilon} \frac{\partial \mathbf{u}_p}{\partial t} = \nabla \cdot \left[ -p \mathbf{I} + \mu_f \left( \nabla \mathbf{u}_p + (\nabla \mathbf{u}_p)^T \right) - \frac{2\mu_f}{3\epsilon} (\nabla \cdot \mathbf{u}_p) \mathbf{I} \right] - \left( \frac{\mu_f}{k} + \frac{Q_{br}}{\epsilon^2} \right) \mathbf{u}_p \quad \text{Ec. 4.16}$$

#### 4.5.2. Modelado de la transferencia de masa

De manera análoga al planteamiento utilizado en el modelado hidrodinámico se realizaron los balances de materia para la especie  $i$  ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , biomasa y  $\text{H}_2\text{O}$ ) en cada dominio del sistema (2 fases fluidas y transporte a través del lecho empacado).

El transporte de materia en las dos fases fluidas se describe a través de la ecuación de transporte para soluciones diluidas (Ec.4.17).

$$\frac{\partial c_{i_f}}{\partial t} = -\mathbf{u}_f \cdot \nabla c_{i_f} + \nabla \cdot (D_{i_f} \nabla c_{i_f}) \quad \text{Ec. 4.17}$$

Donde el campo de velocidades estará determinado por los modelos hidrodinámicos de las fases fluidas descritos anteriormente (Ec.4.14 y 4.15).

Para poder describir el transporte con reacción se propone un modelo homogéneo que incluye los términos de reacción en la ecuación que gobierna al fluido en el lecho (Ec.4.18).

$$\frac{\partial c_{i_p}}{\partial t} = -\mathbf{u}_p \cdot \nabla c_{i_p} + \nabla \cdot (D_{i_p} \nabla c_{i_p}) + R_i \quad \text{Ec. 4.18}$$



### 4.5.3. Modelado de transferencia de energía

Se establecieron los modelos para la transferencia de calor en el biorreactor de la misma manera como fue descrito anteriormente.

Las fases fluidas quedaron descritas mediante el siguiente modelo (Ec. 4.19):

$$\rho_f C_{pf} \frac{\partial T_f}{\partial t} = -\rho_f C_{pf} \mathbf{u}_f \cdot \nabla T_f + \nabla \cdot (k \nabla T_f) \quad \text{Ec. 4.19}$$

De forma análoga al modelo de transporte de materia homogéneo descrito en la ecuación 18, se desarrolló un balance de energía para el fluido en el lecho (Ec. 4.20).

$$(\rho C_p)_p \frac{\partial T_p}{\partial t} = -(\rho C_p)_p \mathbf{u} \cdot \nabla T_p + \nabla \cdot (k_{eff} \nabla T_p) + \underbrace{q_{ev}}_{\text{evaporación}} + \underbrace{\sum_{i=1}^n (-\Delta H_i) R_i}_{\text{reacción}} \quad \text{Ec. 4.20}$$

En la Tabla 4.7 se presentan los parámetros del modelo utilizados en las simulaciones en COMSOL®. Los valores de algunos parámetros se obtuvieron experimentalmente y otros se tomaron de la literatura.

Tabla 4.7. Parámetros del modelo

Parámetro	Descripción	Unidades	Valor	Estatus
$\mu$	Viscosidad dinámica	$Pa * s$	1	Papaegeorgi y col. 1995
$\rho$	Densidad del medio poroso	$kg/m^3$	1381.21	Calculado
$Q_{in}$	Flujo de alimentación	$cm^3/min$	300	Variable de operación
$k$	Permeabilidad	$m^2$	$1.38e^{-4}$	Foumeny y col. 1994
$\epsilon$	Porosidad del lecho	Adimensional	0.4	Variable de operación
$d_p$	Diámetro de partícula (lecho)	$m$	0.3	Variable de operación
$D_{ef}$	Difusividad efectiva	$m^2/s$	$6.16e^{-8}$	Papaegeorgi y col. 1995
$D/uL$	Coefficiente de dispersión axial	$m^2/s$	$1.67e^{-11}$	Calculado
$k_{ef}$	Conductividad térmica efectiva	$W/mK$	0.1048	Lian y col. 2002
$k_p$	Conductividad térmica del medio poroso	$W/mK$	0.158	Calculado
$Y_i$	Rendimiento	$mol_i/mol_j$		Variable de operación
$\mu_{CO_2}$	Tasa específica de producción de $CO_2$	$h^{-1}$	0.64	Calculado
$C_{CO_2max}$	Cantidad máxima producida de $CO_2$	$mg/g_{ms}$	153.48	Calculado
$h_w$	Coefficiente de transferencia de calor	$W/m^2K$	0.0511	Foumeny y col. 1994
$L$	Altura del lecho	$m$	0.02	Calculado
$T_w$	Temperatura de la pared	$K$	318	Variable de operación
$T_{in}$	Temperatura de alimentación	$K$	295	Variable de operación.
$C_{iin}$	Concentración de alimentación	$mol/m^3$	8	Variable de operación
$M$	Contenido de humedad	%	60	Variable de operación.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

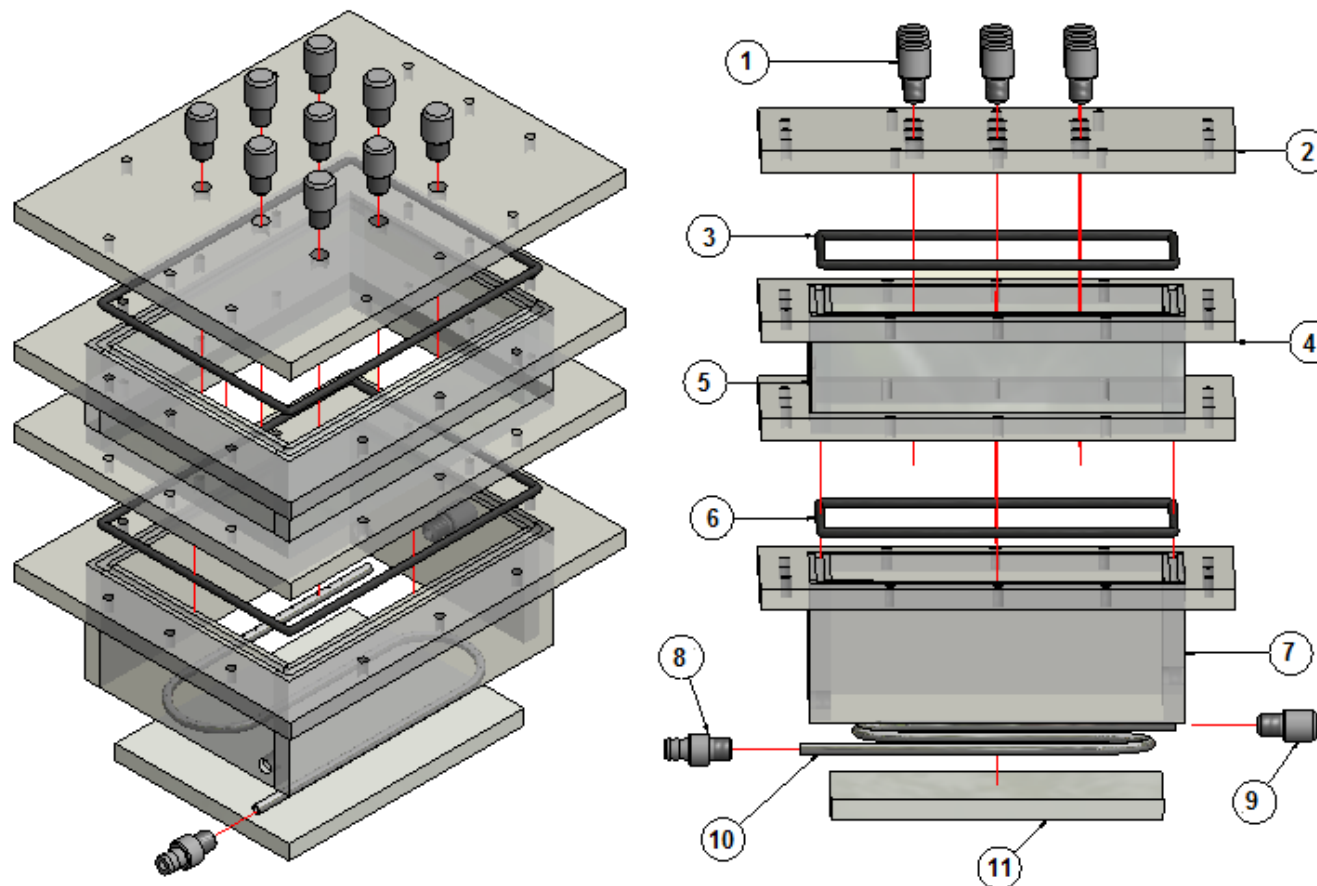
Los resultados se presentan acorde a cada etapa del proyecto. La primera sección corresponde al diseño y construcción del biorreactor, mostrando el sistema experimental compuesto por dos módulos acoplados, así como la instrumentación con los diferentes sensores utilizados.

La segunda sección de resultados corresponde al estudio del biorreactor empleando un sistema abiótico en donde se evaluó la hermeticidad del sistema, la transferencia de masa y de calor. Posteriormente se muestran los resultados obtenidos en la operación del biorreactor en un sistema biótico evaluando la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* en FMS. En esta sección se presenta el análisis de datos y la determinación de parámetros cinéticos aparentes.

Finalmente se presenta el modelado del biorreactor de charolas utilizando Dinámica de Fluidos Computacionales (CFD) mediante el software COMSOL® Multiphysics 4.4. En esta sección se muestra el modelado de la hidrodinámica del sistema y el efecto en los fenómenos de transferencia de calor y masa.

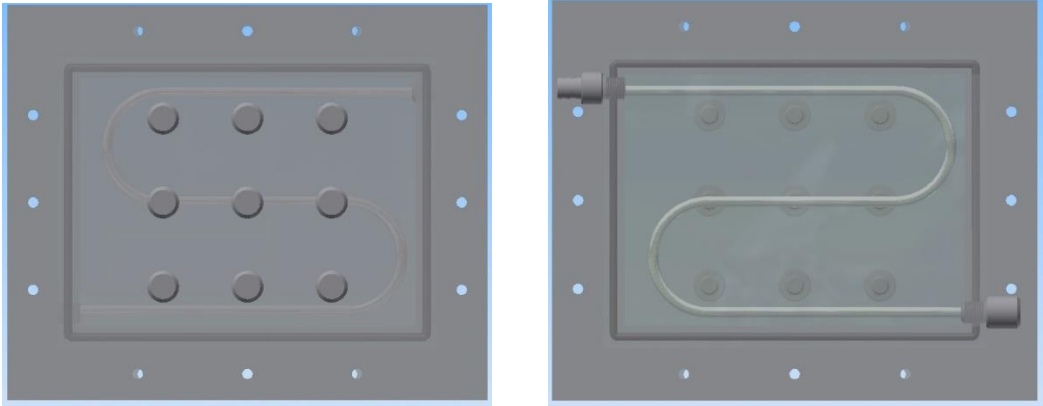
### 5.1. Diseño y construcción

En Figura 5.1 se presenta un esquema explosionado del diseño del biorreactor de charolas, se observan las piezas que componen el sistema y la forma como se acoplan. En la Figura 5.2 se presenta el biorreactor con las piezas completamente acopladas visto desde distintos ángulos, la Figura 5.3 muestra el biorreactor instrumentado dentro del sistema de calentamiento. Así mismo se observan los sensores de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y humedad relativa instalados en la cámara de colecta de gases así como los equipos de adquisición de datos.



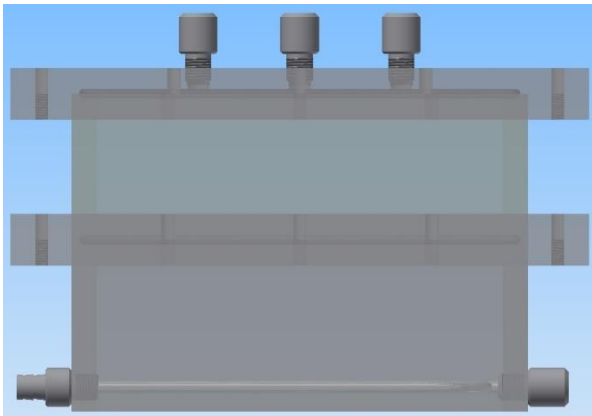
1. Tapones (Puerto toma de muestra)	5. Área de charola	9. Tapón del difusor
2. Tapa superior	6. Junta redonda de neopreno	10. Difusor
3. Junta redonda de neopreno	7. Módulo inferior	11. Base
4. Módulo superior	8. Conexión tipo espiga	

**Figura 5.1.** Esquema explosionado del diseño del biorreactor de charolas

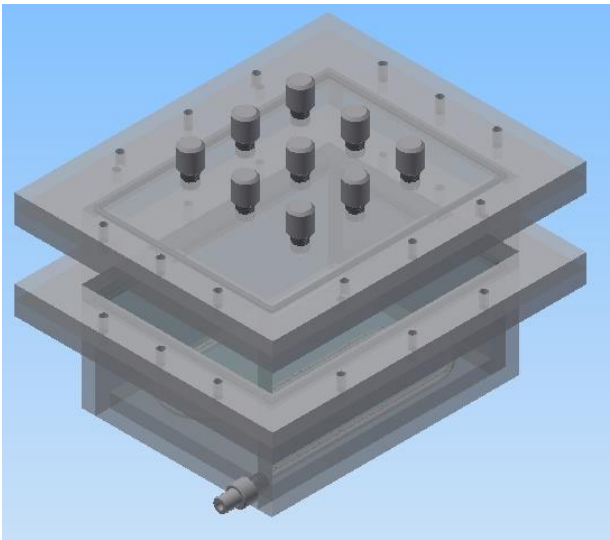


(A) Superior

(B) Inferior

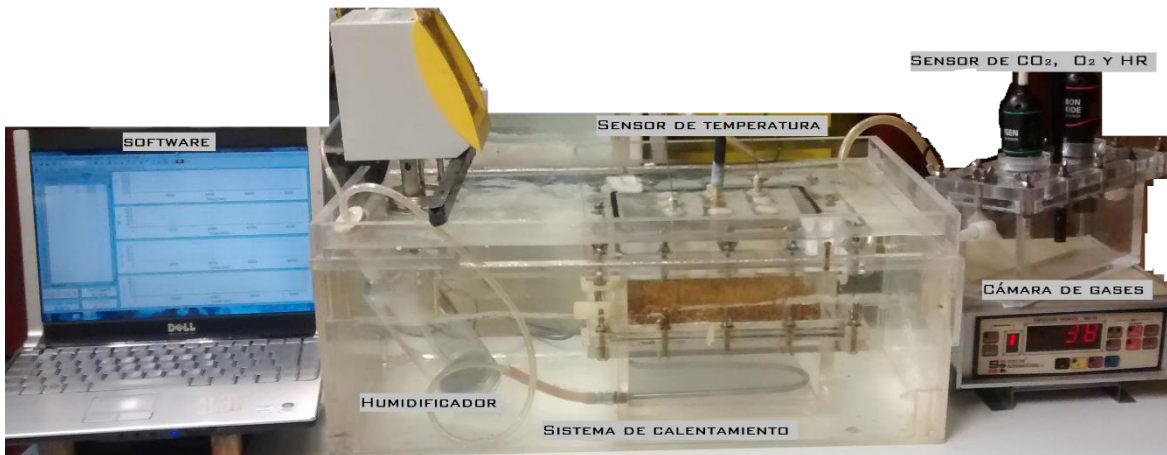


(C) Frontal



(D) Esquina

**Figura 5.2.** Diferentes vistas del diseño del biorreactor de charolas

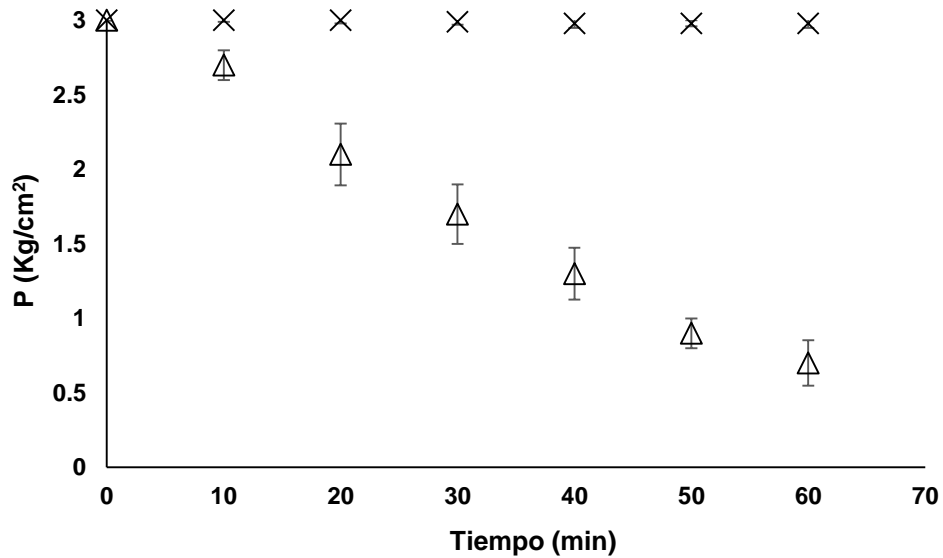


**Figura 5.3.** Instrumentación del biorreactor

## 5.2. Estudios abióticos

### 5.2.1. Hermeticidad

Para la prueba de hermeticidad se probaron dos tipos de juntas de neopreno cuyas propiedades se muestran en la Tabla 4.2. Los resultados de la prueba de hermeticidad se muestran en la Figura 5.4. Al emplear la junta de espuma de neopreno se presentaron caídas de presión importantes, debido a que este tipo de junta no provee un cierre hermético adecuado. Por el contrario, el uso del cordón de neopreno provee un cierre hermético del sistema, ya que no se observan caídas de presión durante la prueba. El cordón de neopreno es más denso que la espuma de neopreno, en este sentido y debido a su geometría, la deformación de la junta redonda es mínima satisfaciendo un mejor sellado entre los módulos que componen la estructura del biorreactor (Ver Figura 5.1).



**Figura 5.4.** Efecto del tipo de junta sobre el perfil de presión en el biorreactor. (X) cordón de neopreno; (Δ) espuma de neopreno

### 5.2.2. Transferencia de calor

Se seleccionaron las zonas 2A-2B-2C y las zonas 1B-2B-3B según la Figura 4.1 para monitorear los gradientes radiales de temperatura a diferentes profundidades del lecho empacado. Se realizaron un conjunto de experimentos dónde se estudió el efecto del flujo de aireación en la transferencia de calor del sistema. Para esto se suministró aire al biorreactor a 20 °C y el baño de calentamiento se mantuvo a 45 °C. Las Figuras 5.5-5.7 muestran los perfiles de temperatura en dirección radial a diferentes profundidades del lecho para flujos de aireación de 200 a 400 mL/min. Se observa que el gradiente de mayor magnitud es el que se forma en el fondo del lecho empacado y el de menor magnitud se tiene en la superficie del lecho para todos los flujos (Tabla 5.1). Se registró una diferencia de  $\approx 23$  °C entre la temperatura del aire de entrada y la temperatura de la fase gaseosa en el espacio de cabeza del biorreactor. Ashley y col. (1999) reportan que en biorreactores de lecho empacado utilizados en FMS que implican la aireación desde la parte inferior del lecho conduce a gradientes axiales de temperatura y con diferencias entre la temperatura del aire de entrada y de salida del sistema hasta más de 20 °C. Por otro lado, la tasa de transferencia de calor de un sólido a la fase gaseosa puede ser aumentada considerablemente a través de la aireación forzada a través del lecho empacado. Donde no

hay dicha convección forzada, el calor se transfiere de la fase sólida a la fase gaseosa esencialmente por un mecanismo de conducción (Finger y col. 1976).

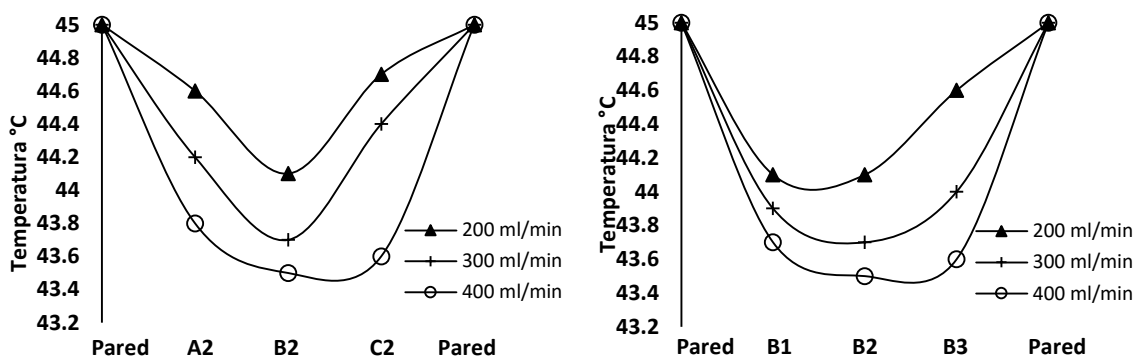


Figura 5.5. Perfil radial de temperatura para una profundidad del lecho de 0mm

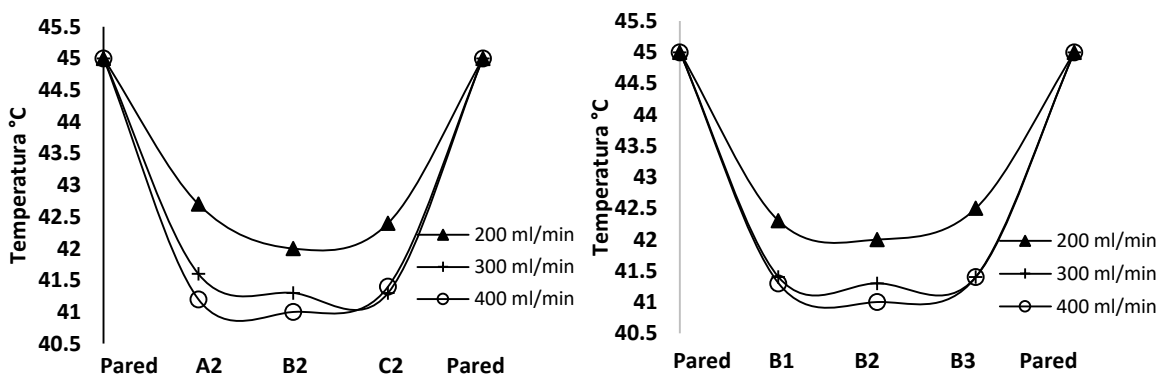


Figura 5.6. Perfil radial de temperatura para una profundidad del lecho de 10mm

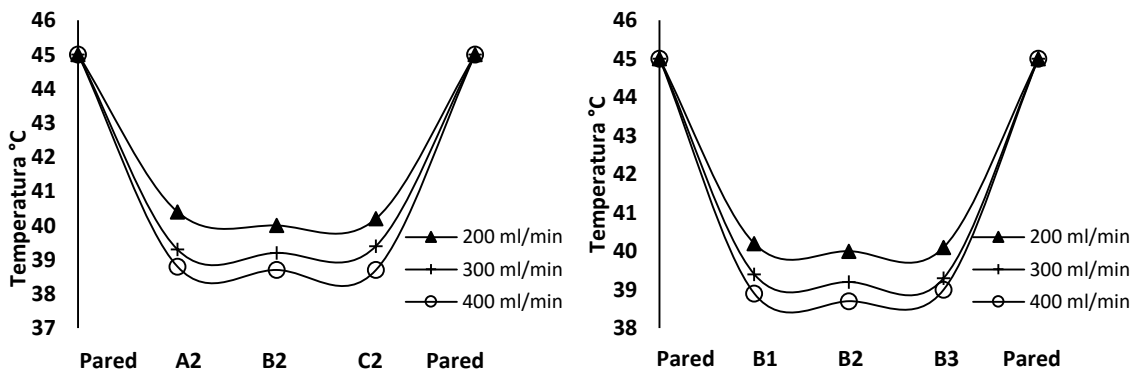


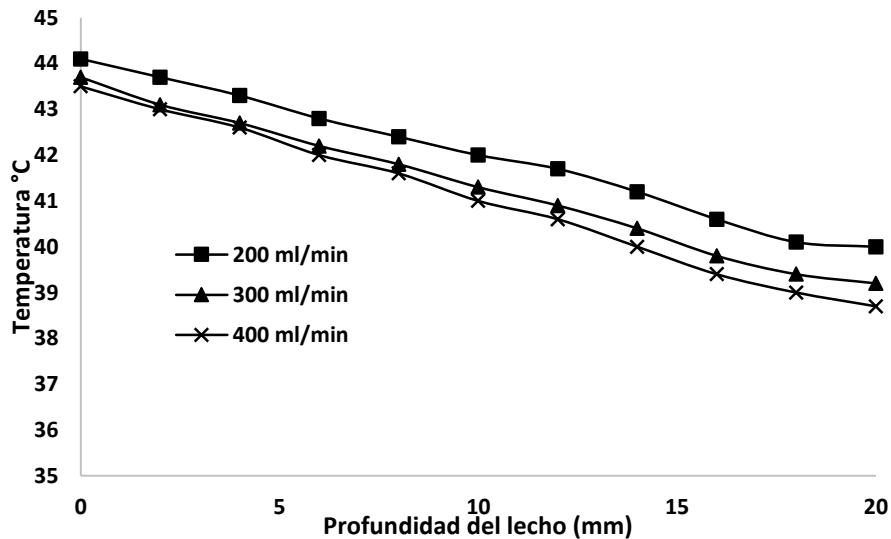
Figura 5.7. Perfil radial de temperatura para una profundidad del lecho de 20mm



**Tabla 5.1.** Gradientes radiales de temperatura a diferentes profundidades del lecho

Flujo	2A-2B-2C			1B-2B-3B		
	0 mm	10 mm	20 mm	0mm	10 mm	20 mm
200 mL/min	0.09 °C/cm	0.3 °C/cm	0.5 °C/cm	0.04 °C/cm	0.3 °C/cm	0.5 °C/cm
300 mL/min	0.13 °C/cm	0.37 °C/cm	0.58 °C/cm	0.13 °C/cm	0.37 °C/cm	0.58 °C/cm
400 mL/min	0.15 °C/cm	0.4 °C/cm	0.63 °C/cm	0.15 °C/cm	0.4 °C/cm	0.63 °C/cm

La Figura 5.8 muestra el perfil de temperatura en dirección axial a diferentes flujos de alimentación de aire. Se observa que un mayor flujo de aireación promueve un mayor enfriamiento de la masa de lecho empacado, alcanzando una diferencia de 4.8 °C entre la temperatura en la superficie ( $\approx 43.5$  °C) y la temperatura en el fondo del lecho (38.7 °C). Ashley y col. (1999) reportaron una diferencia de 5 °C entre las temperaturas de la superficie (40 °C) y del fondo (35 °C) del lecho al suministrar aire a 30 °C en un biorreactor tubular en ausencia de crecimiento microbiano.



**Figura 5.8.** Perfil axial de temperatura

La generación de gradientes de temperatura durante la fermentación es la causa del problema de sobrecalentamiento en la parte superior de los biorreactores de lecho empacado cuando se airean desde la parte inferior. Ashley y col. (1999) mencionan que la parte inferior del lecho se enfría más eficazmente porque está en contacto con el aire frío. A alturas superiores del lecho el aire se precalienta por el contacto con las zonas más

---

calientes durante el tránsito, por lo tanto, el lecho se enfría con menos eficiencia dando lugar a temperaturas más altas durante la fermentación.

### 5.2.3. Distribución de tiempos de residencia (DTR)

Las curvas de respuesta de concentración de oxígeno o curvas de distribución de tiempos de residencia (DTR) se obtuvieron experimentalmente a diferentes flujos de aireación y los parámetros de operación presentados en la Tabla 4.5. Así mismo se obtuvieron las curvas de DTR predichas por el modelo de dispersión (Ecuación 4.12).

En las Figuras 5.9-5.11 se presentan las curvas de dispersión de O<sub>2</sub> experimentales y las curvas obtenidas con el modelo de dispersión. Se observa que el modelo es capaz de describir las observaciones ya que se captura la tendencia experimental. Observaciones similares se han reportado por otros autores (Cruz, 2005; Nardi y col. 1999; Rojas y col. 2010;) empleando otro tipo de configuración de reactores y diferentes trazadores.

Así mismo, se calcularon los parámetros que describen las curvas de DTR por medio de las ecuaciones 4.9, 4.11 y 4.13. En todos los casos el valor de  $D/uL$  fue  $> 0.01$ , es decir, una desviación grande respecto al flujo pistón, lo cual implica que la respuesta al impulso se ensanche y pase por el punto de medida tan lentamente que cambia de forma (se extiende) durante el tiempo que es medida, formando una curva de DTR asimétrica (Levenspiel, 2004). Los valores calculados para los parámetros a partir del análisis de las curvas de DTR se presentan en la Tabla 5.2.

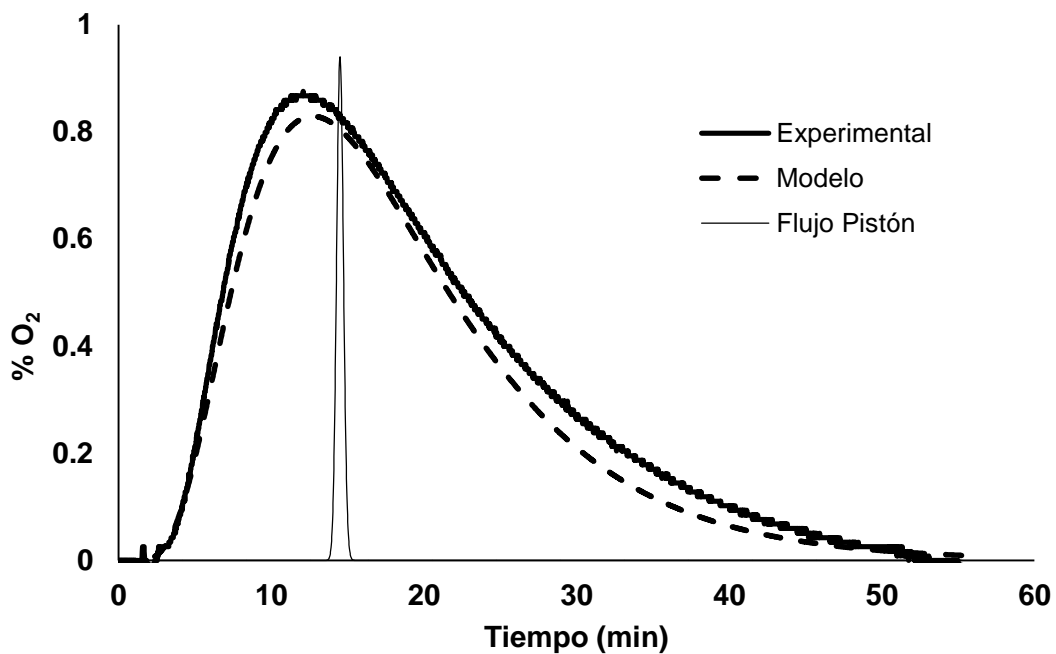


Figura 5.9. Curvas de dispersión de O<sub>2</sub> para un flujo de 200 mL/min.

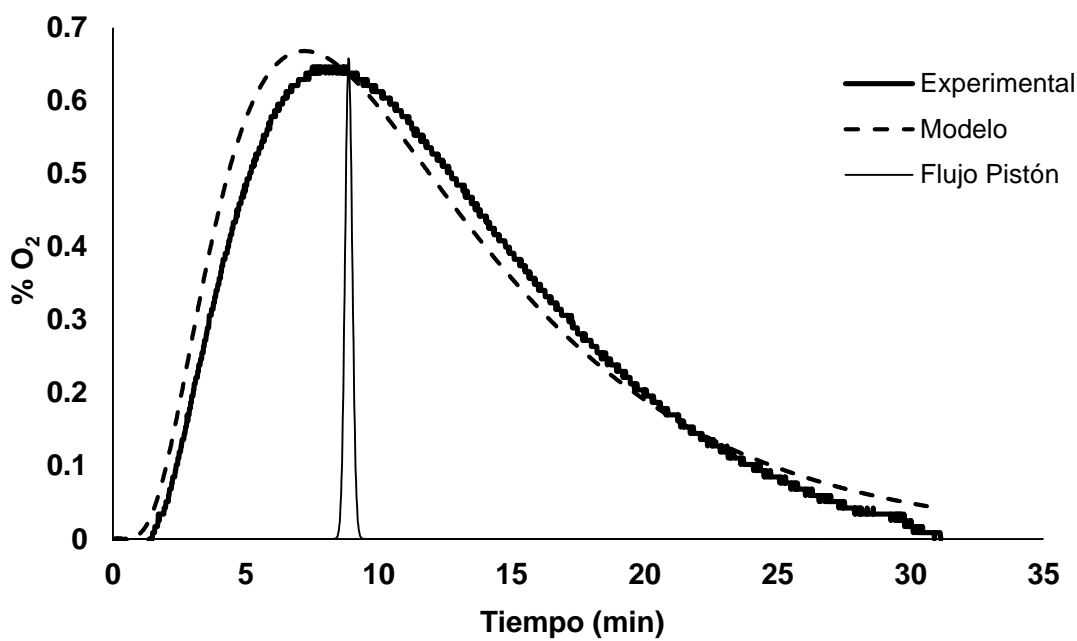


Fig. 5.10. Curvas de dispersión de O<sub>2</sub> para un flujo de 300 mL/min.

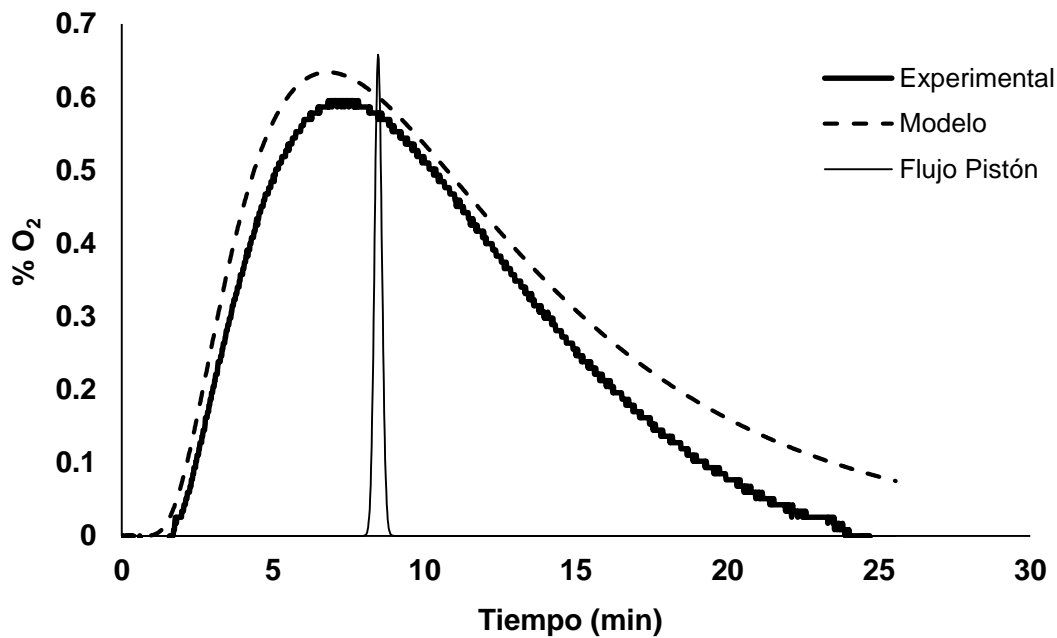


Figura 5.11. Curvas de dispersión de  $O_2$  para un flujo de 400 mL/min.

En la Tabla 5.2 se presentan los valores para el coeficiente de dispersión  $D/uL$  para cada flujo de aireación, se obtuvieron valores de 0.123, 0.196 y 0.220 para flujos de 200, 300 y 400 mL/min respectivamente, así mismo se presenta el perfil predicho por el modelo que en este caso es capaz de describir las observaciones experimentales adecuadamente con un coeficiente de correlación  $>0.95$ ,  $>0.99$  y  $>0.94$  para flujos de 200, 300 y 400 mL/min respectivamente. El valor de  $D/uL$  aumenta conforme aumenta el flujo de aireación, este comportamiento implica la presencia de fenómenos de retromezclado en el sistema a causa del alto flujo de aireación. A manera de comparación se presenta el perfil que hace referencia al flujo pistón en donde el transporte de masa se da por mecanismos difusivos con valores para  $D/uL < 0.001$  donde el mecanismo de dispersión no existe. Nardi y col. 1999 reportan un  $D/uL = 0.141$  para un reactor tubular, empleando verde de bromocresol como trazador y una porosidad de lecho de 0.4. Rojas y col. 2010 reportaron un  $D/uL = 0.145$  para un sistema de lixiviación industrial ajustando los valores experimentales al modelo de dispersión de tanques en serie. En este sentido cada trazador provee una respuesta de transporte diferente y la interpretación de las características de mezclado es

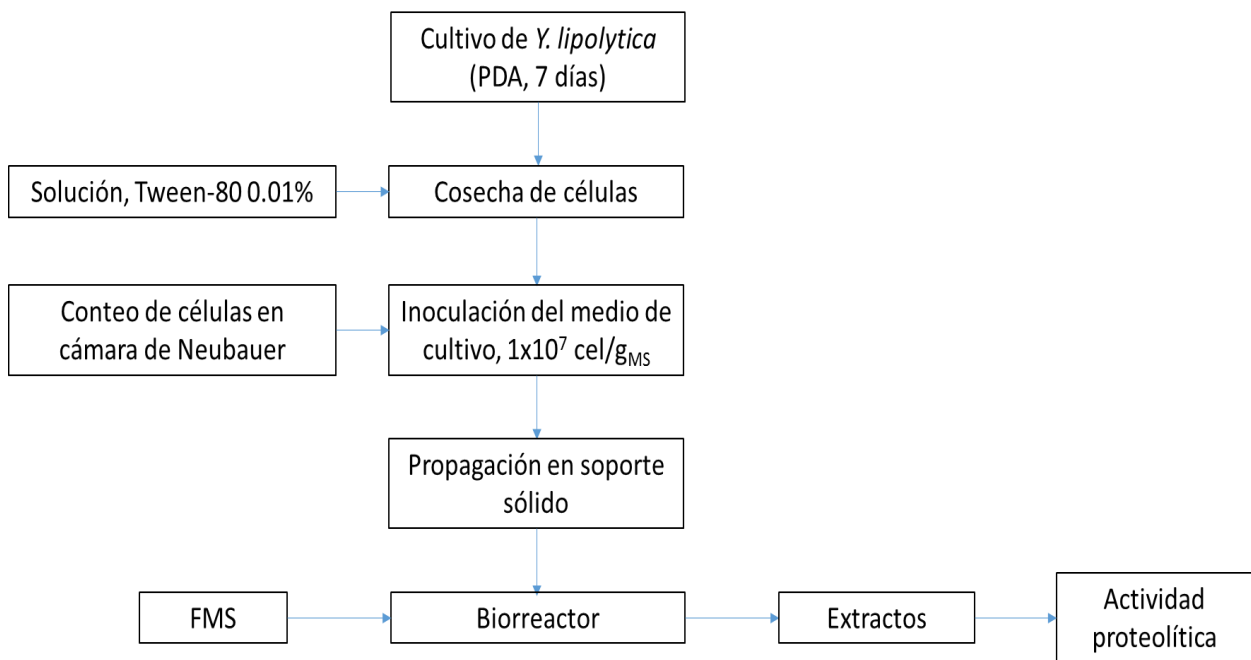
claramente dependiente del trazador elegido y de la geometría de cada sistema para evaluar el fenómeno. De acuerdo con Nardi y col. la difusión del trazador dentro del medio poroso puede ser la principal característica que afecta las curvas de respuesta, causando “colas” largas y, consecuentemente afectando la interpretación de los datos obtenidos experimentalmente.

**Tabla 5.2.** Parámetros de las curvas DTR.

Flujo	$\bar{t}$	$\sigma^2$	$D/uL$
200 mL/min	15.67 min	89.15	0.123
300 mL/min	9.4 min	33.75	0.196
400 mL/min	8.46 min	19.92	0.220

### 5.3. Fermentación en medio sólido (Sistema biótico)

La Figura 5.12 muestra el diagrama general del proceso para la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en FMS empleando el biorreactor de charolas. Cabe mencionar que se consideraron los parámetros de operación presentados en la Tabla 4.5 y la composición de medio de cultivo utilizado (Tabla 4.6).



**Figura 5.12.** Diagrama de flujo para la producción de proteasas por FMS

### 5.3.1. Monitoreo en línea de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Respirometría)

El registro de CO<sub>2</sub> permite evaluar el crecimiento microbiano, validar los modelos de difusión de gases y monitorear la fermentación (Bellon-Maurel y col. 2003). En este trabajo se monitoreó la emisión de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> en la fase gaseosa durante la FMS

#### ➤ Dilución del gas CO<sub>2</sub>

El sensor de gas CO<sub>2</sub> (Vernier®) posee un rango de medición de 0 a 10 %, lo cual representó una limitante en la obtención del perfil completo de producción de CO<sub>2</sub>. Para solucionar este problema se optó por diluir el CO<sub>2</sub> con aire, el cual se suministró a la salida del biorreactor a una proporción de 1:2, tal como se muestra en la Figura 5.13.

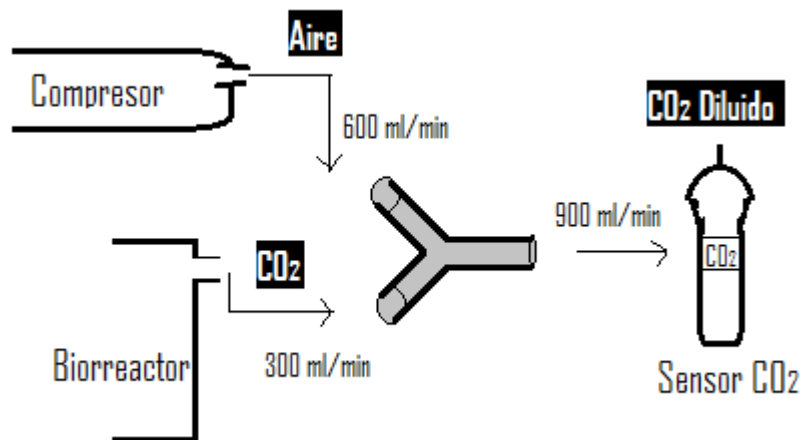


Figura 5.13. Esquema general para la dilución del gas CO<sub>2</sub>

### 5.3.2. Estimación de parámetros cinéticos aparentes

El consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> son el resultado de la respiración; proceso metabólico en donde los microorganismos aerobios invierten gran parte de su energía para el crecimiento (Raimbault, 1998). La tasa de producción de CO<sub>2</sub> se utiliza como un método para estimar el metabolismo microbiano (Saucedo Castañeda y col. 1994).

Se evaluó el perfil respiratorio durante el cultivo de la cepa de *Y. lipolytica*, que se llevó a cabo en condiciones asépticas en el biorreactor de charolas. La humedad se ajustó a 60 % para satisfacer las necesidades de agua del microorganismo (Nagel y col. 2001), evitando el escurrimiento de la fase líquida y la saturación de los poros (Pandey, 1992). Los niveles de CO<sub>2</sub> producido y O<sub>2</sub> consumido se calcularon a partir de las concentraciones (%) de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> experimental, así como la cantidad de materia seca (MS) del lecho empacado. Los resultados de CO<sub>2</sub> producido y O<sub>2</sub> consumido se expresaron como mg/gMS h. La tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μCO<sub>2</sub>) se determinó de acuerdo con lo reportado por Saucedo y col. (1994). Para ello, los valores de producción de CO<sub>2</sub> expresados como mg CO<sub>2</sub>/g<sub>MS</sub>, se ajustaron con el modelo logístico (Ec. 5.1 y 5.2). Para la estimación de μCO<sub>2</sub> se seleccionó el intervalo desde el tiempo inicial al tiempo en el que se obtiene la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub>. La producción de CO<sub>2</sub> se obtuvo por integración numérica de los datos de tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad Ec. 5.1$$

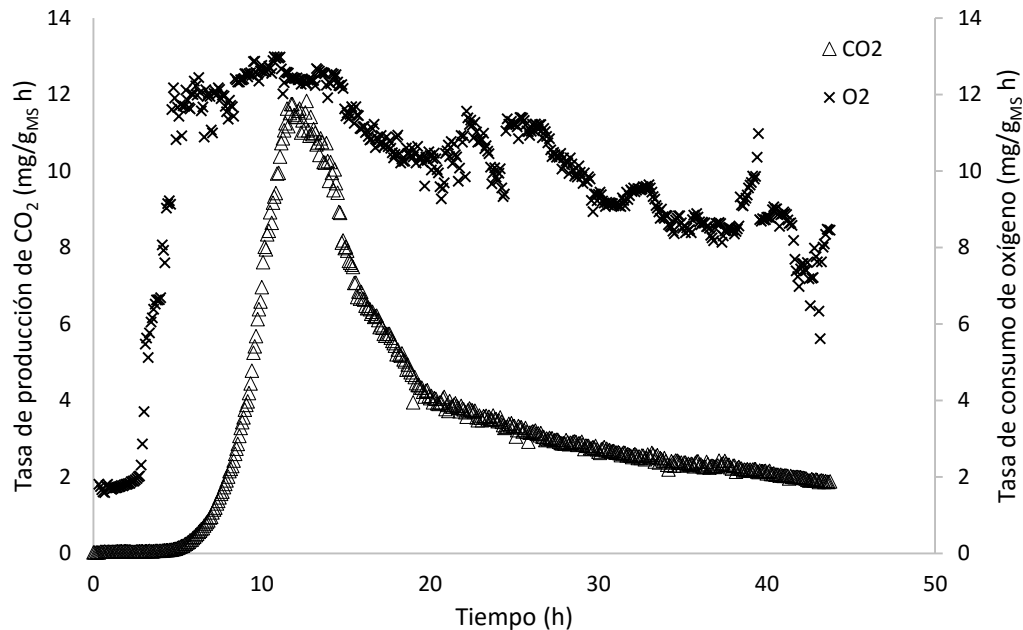
*Forma diferencial*

$$X = \frac{X_{max}}{1 + \left(\left(\frac{X_{max}}{X_0}\right) - 1\right) e^{-\mu_{max}t}} \quad Ec. 5.2$$

*Forma integrada*

El modelo logístico es de los modelos más utilizados para ajustar los datos de crecimiento microbiano, ya que la curva logística integrada es sigmoideal y simétrica con respecto al punto central de inflexión y consta de tres fases, similares a una curva de crecimiento microbiano. Es importante enfatizar que este es un modelo cinético aparente, que permitió determinar el orden de magnitud de los parámetros cinéticos que serán de utilidad en el modelado del biorreactor de charola por CFD.

En la Figura 5.14 se muestra la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y la tasa de consumo de O<sub>2</sub> para el cultivo de *Y. lipolytica*. Se observa que la tasa de producción de CO<sub>2</sub> máxima se obtiene a las 12.66 h de incubación con valor un de 11.83 mgCO<sub>2</sub>/g<sub>MS</sub> h, así mismo se observa el consumo de oxígeno respecto al CO<sub>2</sub> producido.



**Figura 5.14.** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> (Δ); Tasa de consumo de O<sub>2</sub> (x).

Los parámetros cinéticos aparentes estimados a partir del ajuste con el modelo logístico se muestran en la Tabla 5.3, observando un valor de 6.83 h para el  $t_{lag}$ . El valor de  $t_{lag}$  obtenido en el presente trabajo es similar al reportado por Workman y col. (2013) durante el crecimiento de *Y. lipolytica* en cultivos sumergidos, siendo cercano a 6 h. Steele (2000) presenta valores de  $t_{lag}$  de 3 a 10 h para diferentes levaduras crecidas a 30 °C. En el caso de hongos y bacterias, se han reportado valores muy distantes, siendo de 13.7 h para *A. versicolor* sobre aserrín embebido en medio Czapek-Dox (Juarez-Luna, 2014) y de 36 h para un cultivo de *M. anisopliae* en biorreactores tubulares crecido a 32 °C (Porcayo-Loza, 2014). En general, la tasa de crecimiento de las levaduras es más lenta que la de las bacterias, pero más rápida que la tasa de crecimiento de hongos filamentosos. Bajo condiciones óptimas, las levaduras pueden llegar a tener un tiempo de generación alrededor de 1 a 2 h que corresponde a una tasa de crecimiento de 0.7 a 0.35 h<sup>-1</sup>. La tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en este trabajo fue de 0.53 h<sup>-1</sup>. Por otro lado, bajo condiciones desfavorables (escases de nutrientes, temperatura no óptima, actividad de agua menor a la necesaria) la tasa de crecimiento disminuye y el tiempo de la fase *lag* aumenta (Steele, 2000).

La tasa de producción de CO<sub>2</sub> ( $r_{CO_2_{max}}$ ) obtenida en este trabajo (11.83 mg/g<sub>MS</sub>·h) es muy superior respecto al valor reportado con *M. anisopliae* (0.37 mg/g<sub>MS</sub>·h) por Porcayo-Loza (2014). Los parámetros cinéticos son particulares para cada microorganismo, los cuales



varían de acuerdo a su capacidad de desarrollo en las condiciones utilizadas. En el trabajo reportado por Juárez-Luna (2014) se obtuvo un valor de  $r_{CO_2max}$  de 7.56 mg/g<sub>ms</sub>·h con *A. versicolor* crecido a 37.5 °C sobre aserrín.

**Tabla 5.3.** Parámetros cinéticos aparentes del cultivo de *Y. lipolytica*

	<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
$P_{CO_2final}$	(mg/g <sub>ms</sub> )	154.83 ± 10.32
$\mu$	(h <sup>-1</sup> )	0.53 ± 0.06
$r_{CO_2max}$	(mg/g <sub>ms</sub> · h)	11.83 ± 0.81
<i>lag</i>	(h)	6.83 ± 0.82
$R^2$		> 0.99

Los parámetros cinéticos aparentes presentados en la Tabla 5.3 servirán como referencia para llevar a cabo el modelado del biorreactor en condiciones bióticas con el software COMSOL® Multiphysics.

En la Figura 5.15 se presenta la cinética de producción de proteasas por *Y. lipolytica*. La máxima producción de proteasa (40.10 U/g<sub>MS</sub>) se obtiene a las 36 h, y a partir de las 48 h comienza un decremento. No obstante, aún se registra actividad proteasa después de 72 h de fermentación. Resultados similares fueron obtenidos por Farías y col. (2014), en la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en FMS empleando biorreactores de charolas, quienes reportan la máxima actividad proteasa (53 U/g<sub>MS</sub>) a las 32 h de fermentación. La diferencia en los niveles de producción de proteasa respecto a trabajos similares puede ser debido a las condiciones de cultivo y sustrato utilizado. En un estudio sobre la producción de proteasas de *Y. lipolytica* en FMS a partir de harina de pescado en biorreactores de columna, Hernández y col. (2011) reportaron la máxima actividad proteasa (252 U/mL) a las 36 h de fermentación a 45 °C.

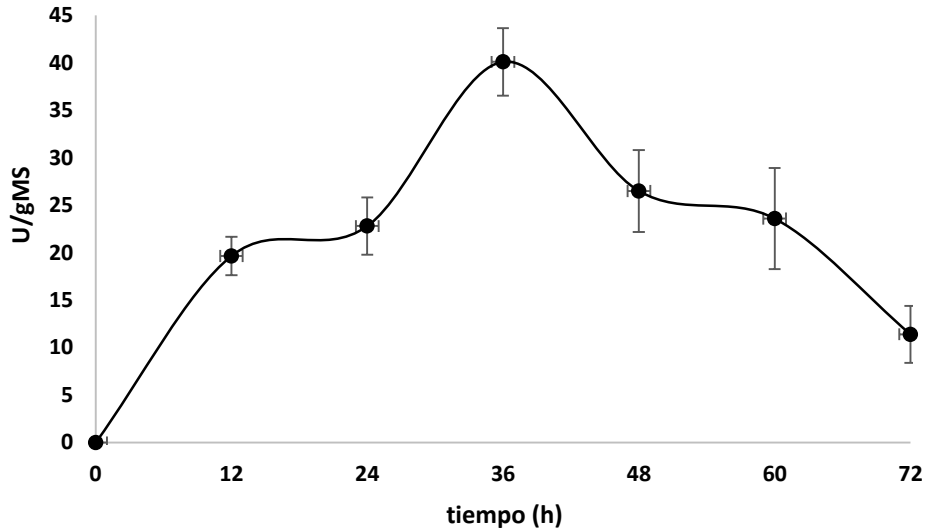
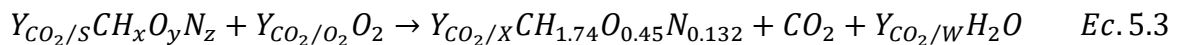


Figura 5.15. Producción de proteasas por *Y. lipolytica* en un biorreactor de charolas.

### 5.3.3. Balance estequiométrico

Anteriormente se reportó que los coeficientes de rendimiento pueden ser obtenidos a partir de modelos estequiométricos específicos mediante balances elementales (Gutiérrez-Rojas y col. 1995; Khanahmadi y col. 2004; Smits y col. 1999).

Cuando se emplea un sustrato complejo, como en el caso de subproductos de frutas y verduras se puede proponer una biorreacción como la que describe la Ecuación 5.3. Los coeficientes de rendimiento pueden expresarse en base *C-mol* (Figuroa-Montero, 2011), de tal manera que:



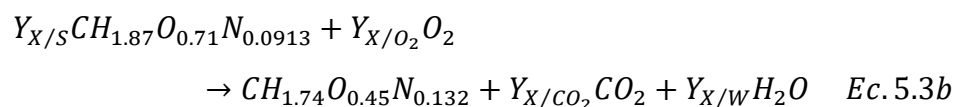
La Ecuación 5.3 es útil cuando se conoce la composición elemental del sustrato (x, y, z). Todos los coeficientes de rendimiento pueden ser obtenidos algebraicamente. Una vez definido el balance estequiométrico de la ecuación de biorreacción, se pueden estimar o calcular el consumo y/o producción de sus elementos a partir de la medición de uno de ellos, por ejemplo el CO<sub>2</sub> medido experimentalmente.

La formulación de ecuaciones de reacción en FMS usando residuos orgánicos 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), (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 el cálculo de la biomasa formada, del agua metabólica y generación de calor metabólico a partir de la medición del CO<sub>2</sub> producido (Figuroa- Montero, 2011).

**Tabla 5.4.** Coeficientes de rendimiento obtenidos a partir de los balances elementales (C, H, O y N) en base al CO<sub>2</sub> producido de la ecuación de reacción para el crecimiento de *Y. lipolytica*

Coeficiente de rendimiento	Valor	Unidades
$Y_{CO_2/S}$	3.38	[Cmol S · molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> ]
$Y_{CO_2/O_2}$	0.89	[mol O <sub>2</sub> · molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> ]
$Y_{CO_2/X}$	2.38	[Cmol X · molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> ]
$Y_{CO_2/W}$	1.08	[mol W · molCO <sub>2</sub> <sup>-1</sup> ]

Se asumió la siguiente ecuación para el crecimiento de *Y. lipolytica*, considerando un crecimiento aerobio sin formación de producto, a partir de la Ecuación 5.3, se tiene en base a *C-mol* de biomasa:



En la Ecuación 5.3b se asume que la composición elemental para *Y. lipolytica* es  $CH_{1.74}O_{0.45}N_{0.132}$  (Ochoa y col. 2014) y  $CH_{1.87}O_{0.71}N_{0.0913}$  es la composición elemental para el sustrato empleado en la fermentación (capítulo 4.2.2.1). En la Tabla 5.5 se presentan los valores y las unidades de los coeficientes de rendimiento obtenidos al realizar los balances elementales sobre la Ecuación 5.3b. Se obtuvo un coeficiente de rendimiento  $Y_{X/S}$  de 0.7, similar al que reportaron Workman y col. (2013) con un valor de 0.69 para un cultivo de *Y.*

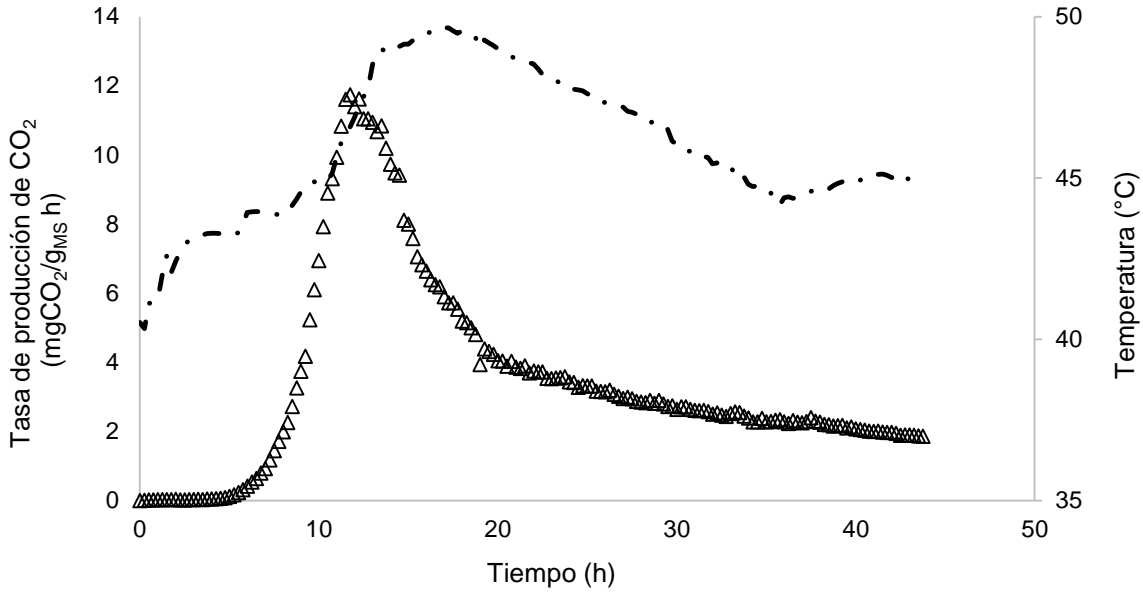
*lipolytica* a 30 °C en biorreactores agitados con glucosa (0.65 Cmol/L) como única fuente de carbono. Kawasse y col. (2003) reportaron un valor de  $Y_{X/S}$  de 0.76 en cultivos sumergidos de *Y. lipolytica* bajo condiciones de estrés térmico y con glucosa como fuente de carbono. A partir del balance estequiométrico se estimaron los coeficientes  $Y_{O_2/CO_2}$  y  $Y_{W/CO_2}$ , obteniéndose valores de 0.90 y 1.06 respectivamente. Figueroa-Montero, (2011) reporta valores de 0.98 para  $Y_{O_2/CO_2}$  y de 1.02 para  $Y_{W/CO_2}$  en el crecimiento de *A. niger* sobre residuos agroindustriales en un biorreactor de charola. Así mismo, se obtuvo un valor para  $Y_{CO_2/S}$  de 0.29, similar al obtenido por Workman y col. (2013) con un valor 0.30 durante el crecimiento de *Y. lipolytica* en cultivo sumergido con glucosa (0.65 cmol/L) como fuente de carbono.

**Tabla 5.5.** Coeficientes de rendimiento obtenidos a partir de los balances elementales (C, H, O y N) de la ecuación de reacción para el crecimiento de *Y. lipolytica*

Coeficiente de rendimiento	Valor	Unidades
$Y_{X/S}$	0.70	[Cmol X · Cmol S <sup>-1</sup> ]
$Y_{O_2/S}$	0.26	[mol O <sub>2</sub> · Cmol S <sup>-1</sup> ]
$Y_{CO_2/S}$	0.29	[mol CO <sub>2</sub> · Cmol S <sup>-1</sup> ]
$Y_{W/S}$	0.31	[mol W · Cmol S <sup>-1</sup> ]

#### 5.4. Calor de reacción

Al observar el perfil de temperatura durante el cultivo de *Y. lipolytica* (Figura 5.16), se pudo apreciar que la temperatura se mantiene constante durante la fase *lag*. No obstante, cuando el cultivo llega a la fase exponencial, se observa un cambio drástico en la temperatura hasta alcanzar los 49.6 °C a las 16.7 h de incubación. Posteriormente, cuando la tasa de producción de CO<sub>2</sub> comienza a decaer, la temperatura también disminuye hasta alcanzar nuevamente el equilibrio térmico en el sistema. Debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen típica de los procesos de FMS, la generación de calor microbiano por unidad de volumen es mucho mayor que la generada en cultivos líquidos (Smith y col. 1988). El aumento en la temperatura del cultivo se debe principalmente a la exotermicidad de las reacciones metabólicas llevadas a cabo por el microorganismo. Por lo tanto, es importante medir la evolución de CO<sub>2</sub> durante los procesos de FMS ya que está directamente relacionada al incremento en la temperatura (Figueroa-Montero, 2011).



**Figura 5.16.** Perfil de temperatura (- · -) y tasa de producción de CO<sub>2</sub> (Δ) durante el cultivo de *Y. lipolytica*.

#### 5.4.1. Cálculo de la entalpía de reacción ( $\Delta H_r$ )

La entalpía de reacción se refiere a la cantidad de calor que se absorbe o como en este caso que se desprende, es decir, una reacción exotérmica (Wyllen, 1985). La diferencia de calor, o más exactamente el cambio de entalpía que se da en una reacción se calcula la siguiente expresión:

$$\Delta H_r = \sum n * \Delta H_{C_{Productos}} - \sum n * \Delta H_{C_{Reactivos}} \quad Ec. 5.4$$

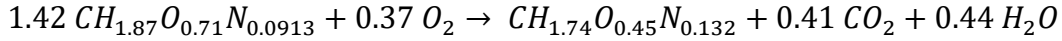
Dónde:

$\Delta H_{C_{Productos}}$  = Entalpía de combustión de productos

$\Delta H_{C_{Reactivos}}$  = Entalpía de combustión de reactivos

$n$  = Número de moles

El cálculo de la entalpía de reacción se realizó partiendo del balance estequiométrico para la formación de biomasa, tomando en cuenta los coeficientes estequiométricos en base *C-mol* de biomasa. El balance estequiométrico se presenta a continuación:



Para calcular el valor del calor de combustión de compuestos carbónicos se aplicó una correlación simple reportada por Tillman, (1978). En este caso el sustrato y la biomasa.

$$\Delta H_C = 188 C - 718 \frac{Btu}{lb} \quad Ec. 5.5$$

Dónde C es el porcentaje de carbono

De acuerdo a los datos mostrados en el capítulo 4.2.2.1 se tiene un porcentaje de carbono del 54 % en la composición del medio poroso, así como un porcentaje de carbono del 52 % en la composición de la biomasa (Reed 1985). Para cada compuesto se obtuvo el valor de  $\Delta H_C$  sustituyendo el valor de C (%) en la Ecuación 5.5.

$$\Delta H_C \text{ medio poroso} = 9434 \frac{Btu}{lb} = 582 \frac{KJ}{mol}$$

$$\Delta H_C \text{ Biomasa} = 9095.6 \frac{Btu}{lb} = 482.76 \frac{KJ}{mol}$$

Mediante la Ecuación 5.4 se obtuvo:

$$\text{Entalpía de reacción} = \Delta H_r = 482.76 \frac{KJ}{mol} - 1.42 \left( 582 \frac{KJ}{mol} \right) = -343 \frac{KJ}{mol}$$

El valor obtenido para la entalpía de reacción ( $\Delta H_r$ ) es negativo, lo que indica que la reacción es exotérmica, es decir, libera calor. El calor liberado en la reacción es

consecuencia de la actividad metabólica del microorganismo y es la respuesta al aumento de la temperatura en el lecho empacado durante la fermentación (Figura 5.16). En este trabajo se obtuvo un valor de  $-343 \frac{KJ}{mol}$ . Stockar y col. (1999) reportan un valores de  $-357 a -649 \frac{KJ}{mol}$  para la entalpía de reacción del crecimiento aerobio de *Candida lipolytica* ahora *Yarrowia lipolytica* en varios sustratos.

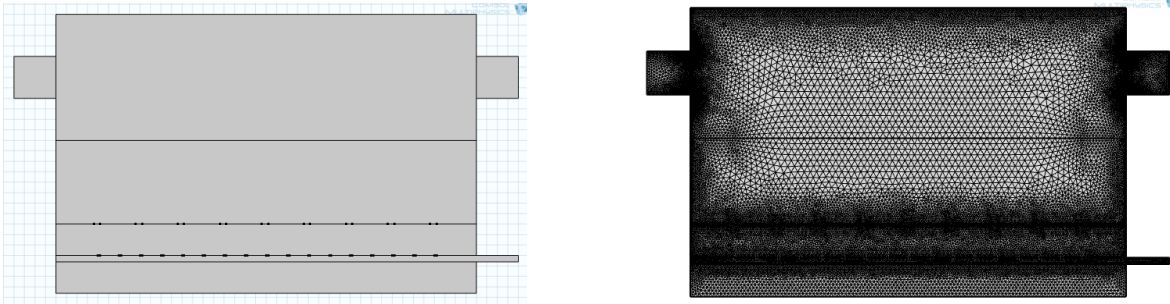
## 5.5. Modelado del biorreactor mediante CFD

Inicialmente el modelado se realizó considerando al biorreactor como un sistema abiótico. Se muestran los perfiles de velocidad a diferentes flujos de alimentación (200-400 mL/min) posteriormente se presentan los perfiles de concentración de oxígeno y de calor considerando sólo la hidrodinámica del sistema. Por último se muestra el modelado del biorreactor considerando un sistema biótico, en este apartado se presentan los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> así como el efecto que tiene sobre éstos un cambio en la tasa específica de crecimiento microbiano mediante simulaciones en COMSOL®.

### 5.5.1. SISTEMA ABIÓTICO

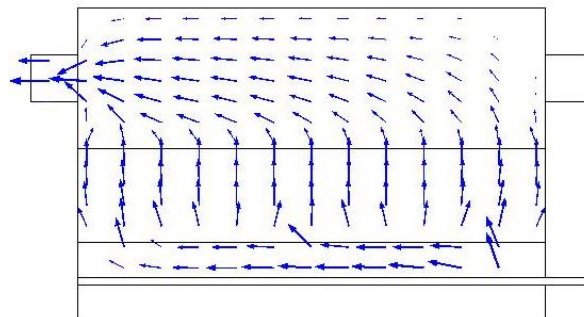
#### 5.5.1.1. Transporte de momento

En la Figura 5.17a se presenta el dibujo del biorreactor en 2 dimensiones en la interface de trabajo de COMSOL. La Figura 5.17b muestra el malleo que se realizó al biorreactor para dar solución a las ecuaciones de transporte de momento, calor y masa descritas anteriormente en el capítulo 4.5.



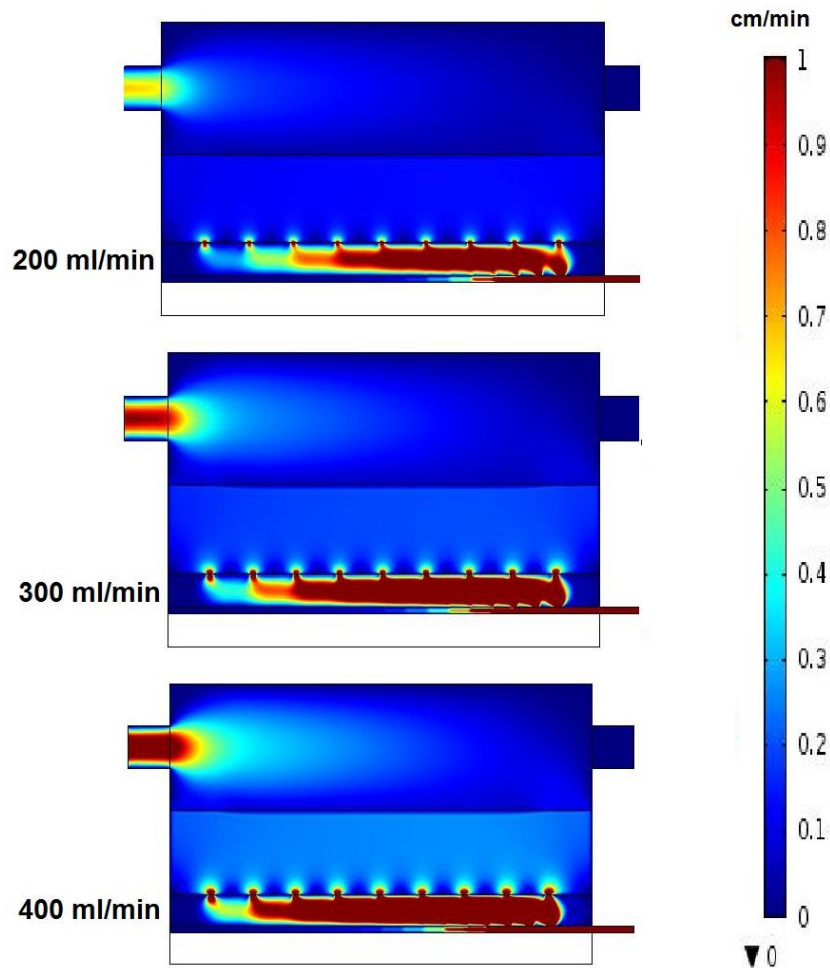
**Figura 5.17.** a) Dibujo del biorreactor en COMSOL; b) Malleo generado en COMSOL

En la Figura 5.19 se muestra el campo de velocidad en el biorreactor de charolas en estado transitorio considerando los parámetros del modelo presentados en la Tabla 4.7. Se varió el flujo de aireación tomando como referencia los flujos probados en la etapa experimental (200, 300 y 400 mL/min) y el coeficiente de dispersión axial  $D/uL$  calculado en el capítulo 5.2.3. Se observa que la magnitud de velocidad está en un rango de 0 – 1 cm/min, dependiendo la zona del biorreactor. Con ayuda de la Figura 5.18 se puede identificar la dirección de la magnitud de velocidad respecto a la geometría del biorreactor y mediante la escala de colores se logra percibir la diferencia entre la magnitud de velocidad a la entrada del sistema respecto a las demás zonas del biorreactor (Figura 5.19). La velocidad máxima se encuentra a la entrada y conforme pasa a través del difusor esta va disminuyendo paulatinamente con el único fin de realizar una aireación homogénea y con tiempos de residencia necesarios a lo largo del sistema, así mismo se observa que cuanto mayor sea el flujo de alimentación, mayor será la velocidad del flujo a la salida.



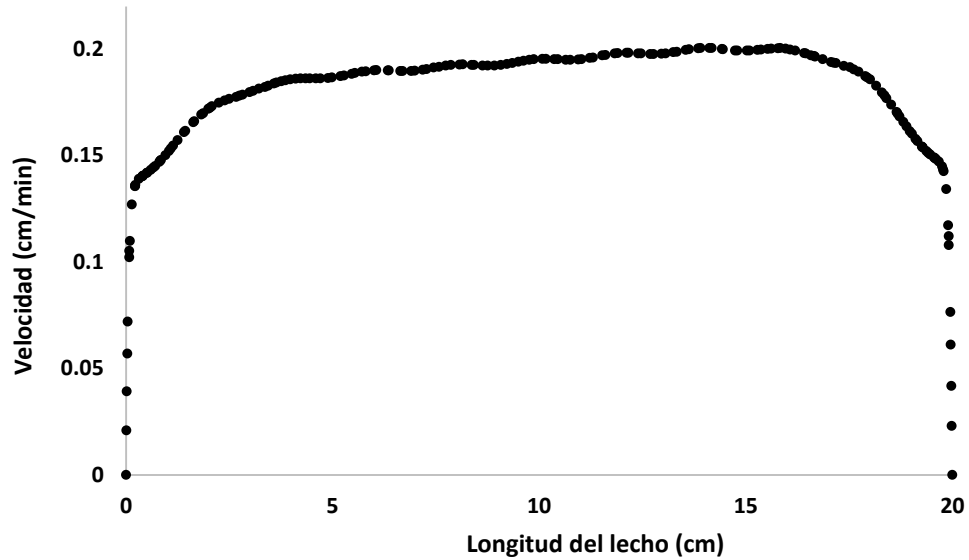
**Figura 5.18.** Superficie de flechas del transporte de momento en el biorreactor para un flujo de aireación de 400 mL/min.





**Figura 5.19.** Simulaciones del efecto del flujo de aireación sobre la hidrodinámica en el biorreactor de charolas.

En la Figura 5.20 se presenta el perfil de la magnitud de velocidad radial en el lecho empacado obtenido de la simulación en COMSOL. La velocidad del flujo de aireación es homogénea a lo largo de todo el lecho. Sin embargo, en zonas cercanas a las paredes la velocidad de aireación disminuye paulatinamente debido a los esfuerzos corte. Este mismo comportamiento se observó en las simulaciones a los tres flujos de aireación evaluados. Resultados similares fueron reportados por Jou y col. (2011) en simulaciones de transporte de momento en un biorreactor de doble charola, quienes reportaron una disminución en la velocidad del flujo de aireación en la zona comprendida entre las paredes de las charolas.



**Figura 5.20.** Perfil de magnitud de velocidad radial en el lecho empacado para un flujo de 300 mL/min.

#### 5.5.1.2. Transporte de masa de oxígeno en el sistema abiótico

En la Figura 5.21 se presenta del perfil de transporte de oxígeno en el biorreactor respecto al tiempo a diferentes flujos de aireación. La simulación de transporte de oxígeno se acopló al modelo hidrodinámico descrito anteriormente. Se observa que al aumentar el flujo de aireación, la concentración de oxígeno aumenta notablemente en todo el sistema, sin embargo, debido a la hidrodinámica del sistema el transporte de oxígeno se ve afectado cerca de las paredes. Se observa como es la dispersión oxígeno desde el tiempo inicial hasta el tiempo en que se alcanza la máxima concentración de oxígeno en el sistema.

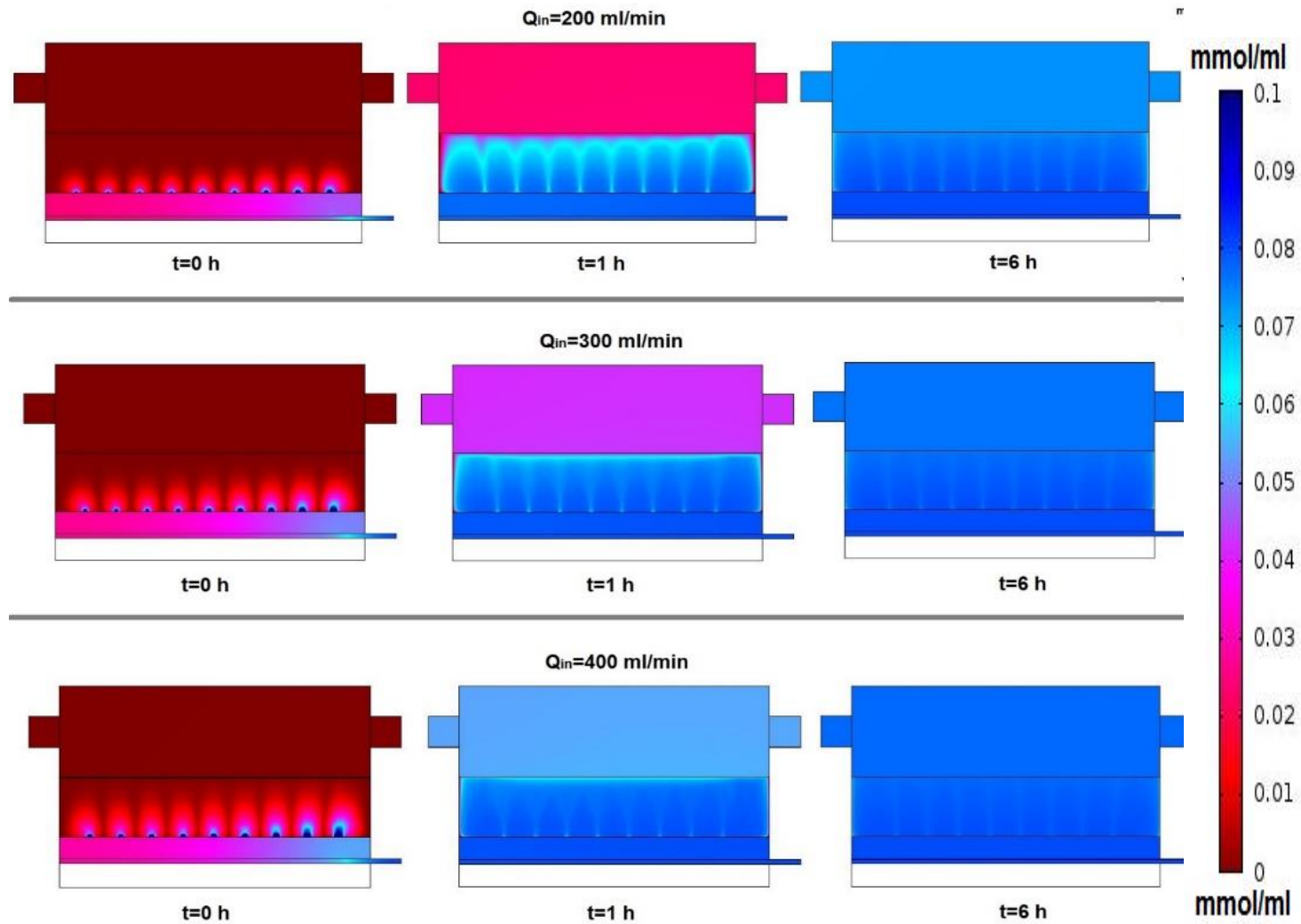
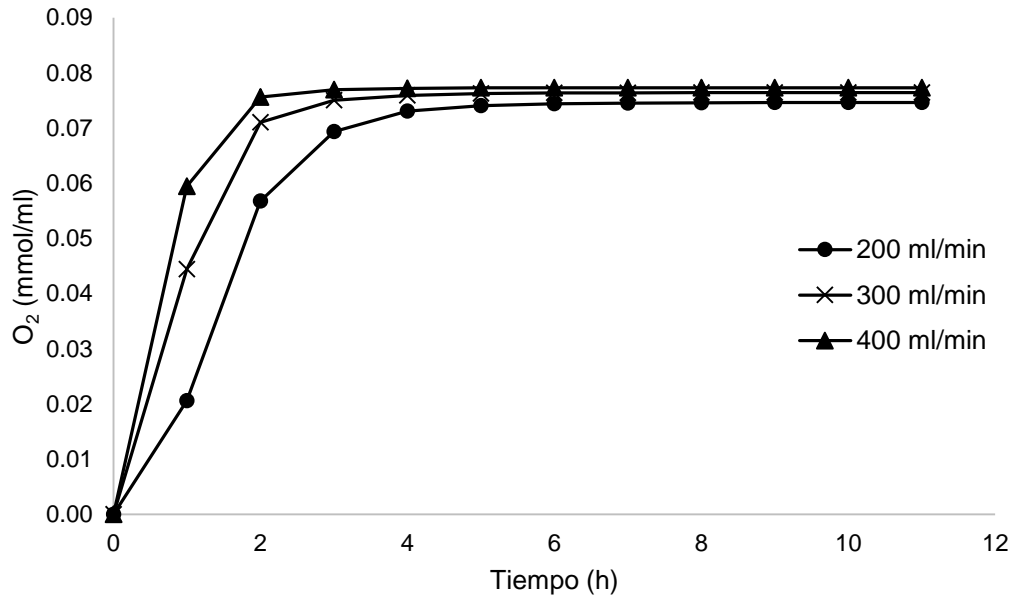


Figura 5.21. Perfil de concentración de  $O_2$  en el biorreactor a diferentes flujos de aireación.

A partir de las simulaciones de transporte de masa de  $O_2$ , se obtuvo el perfil de concentración de  $O_2$  en el biorreactor (Figura 5.22) para los tres flujos de aireación. Se observa que cuanto mayor es el flujo de aireación, la concentración de  $O_2$  aumenta en un menor tiempo. Se aprecia que el tiempo en que se alcanza la concentración máxima de  $O_2$  en el sistema es de cercano a 4 h para los flujos de 300 y 400 mL/min y de 5 h para el flujo de 200 mL/min.



**Figura 5.22.** Perfil de concentración de  $O_2$  en el biorreactor.

### 5.5.1.3. Transporte de calor en el sistema abiótico

La Figura 5.23 muestra el perfil de temperatura en el biorreactor a los diferentes flujos de aireación a diferentes tiempos. Al igual que en la etapa experimental se consideró una temperatura de 20 °C para el flujo de aireación. Con la ayuda de la escala de color se logra apreciar la diferencia entre las temperaturas de las diferentes zonas del sistema, se observa que inicialmente el biorreactor se encuentra a 45 °C y conforme se suministra el flujo de aireación frío, la temperatura comienza a disminuir notablemente, este fenómeno de transporte de calor se observó en las simulaciones a los diferentes flujos de aireación (200-400 mL/min), siendo a 400 mL/min donde la temperatura disminuye más rápidamente debido al enfriamiento que se produce por el transporte de calor por convección entre el flujo de aire y las paredes del biorreactor.

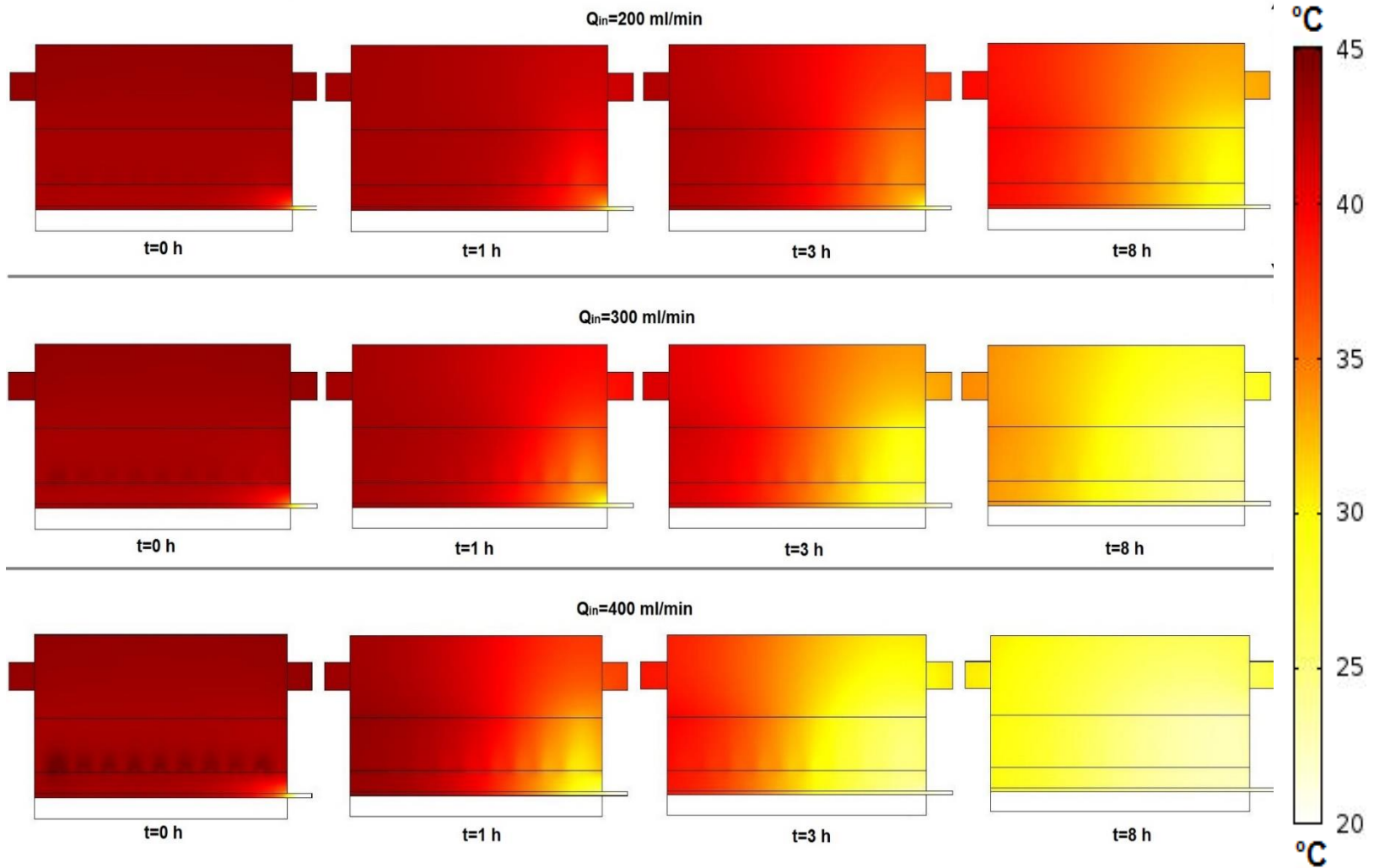
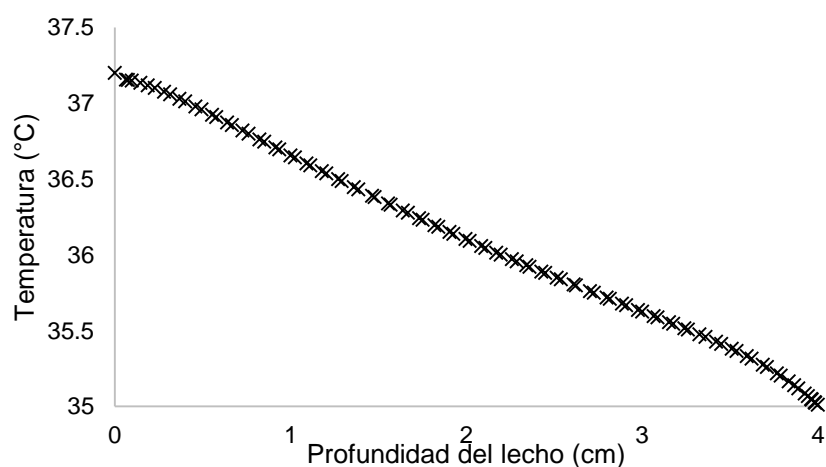


Figura 5.23. Perfil de temperatura en el biorreactor a diferentes flujos de aireación

En la Figura 5.24 se presenta el perfil axial de temperatura obtenido mediante simulación de transporte de calor, se observa una diferencia de 2.2 °C entre la temperatura del fondo y de la superficie del lecho empacado, siendo menor la temperatura del fondo del lecho dado que esta en contacto directo con el flujo de aire frío. Resultados similares son reportados por Cheng, (2013) en simulaciones mediante CFD de un biorreactor de charolas para FMS con aireación forzada en donde obtiene una diferencia de 1 – 2 °C entre las temperaturas del fondo y la superficie del lecho. En el presente trabajo en la etapa experimental se observó un gradiente axial de temperatura de 2.9 °C/cm en el lecho al suministrar aire a 20 °C (Figura 5.8), a pesar de que el gradiente de temperatura experimental es mayor al obtenido por simulación, la tendencia de los perfiles es la misma.



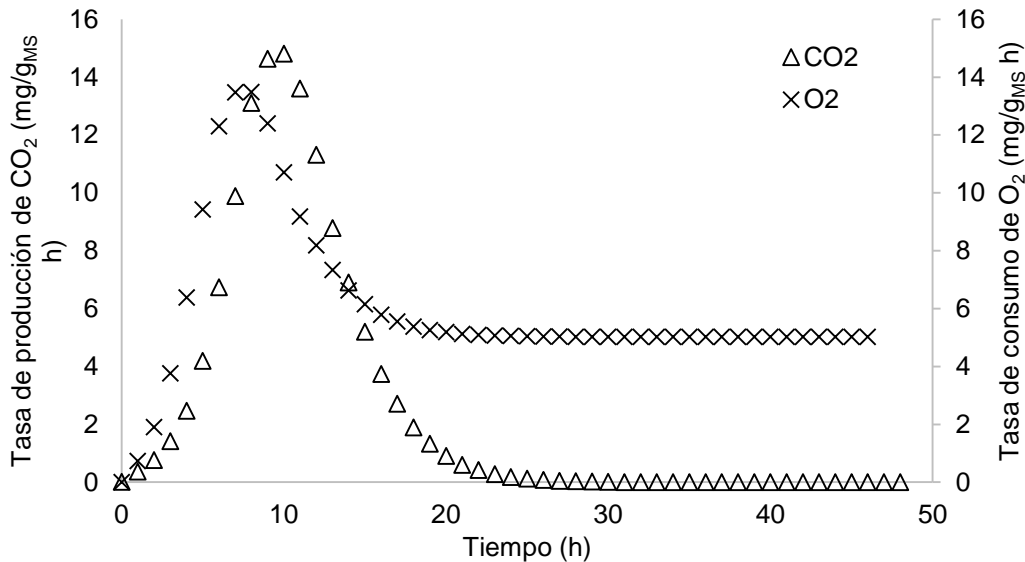
**Figura 5.24.** Perfil axial de temperatura

## 5.5.2. SISTEMA BIÓTICO

### 5.5.2.1. Biorreacción

La Figura 5.25 muestra el perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en mg/g<sub>MS</sub> h obtenido a partir del análisis de datos obtenidos mediante simulaciones en COMSOL, en este caso se utilizaron los valores de los parámetros cinéticos aparentes (Tabla 5.3) para alimentar el programa. En este sentido, se asumió que la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) es igual a la tasa específica de crecimiento ( $\mu_X$ ) para realizar las simulaciones. El perfil obtenido por simulaciones se asemeja al obtenido en la etapa experimental (Figura 5.14)

en donde la máxima producción de CO<sub>2</sub> (11.83 mg/g<sub>MS</sub> h) se logra a las 12 h de cultivo mientras que en simulaciones se obtiene la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> (14.81 mg/g<sub>MS</sub> h) a las 10 h. Así mismo se presenta el perfil de consumo de oxígeno respecto al CO<sub>2</sub> producido, en este caso se observa un perfil muy similar al obtenido experimentalmente, en donde el oxígeno que se consume es casi proporcional al CO<sub>2</sub> que se produce en las primeras fases del crecimiento.

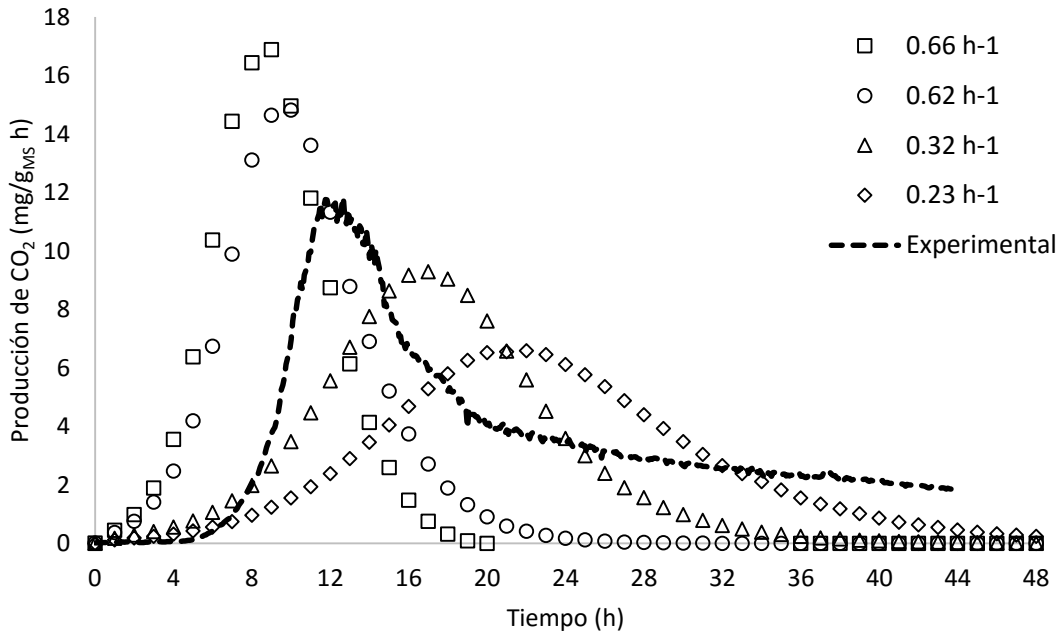


**Figura 5.25.** Perfil de CO<sub>2</sub> obtenido mediante simulación en COMSOL con  $\mu_x=0.53 \text{ h}^{-1}$

Por otro lado, se realizaron simulaciones variando el valor de la tasa específica de crecimiento con el objetivo de determinar el efecto que tiene este parámetro en la producción de CO<sub>2</sub> y a fin de verificar la respuesta que otorga el programa a cambios sensibles en los valores de los parámetros del modelo.

Las Figuras 5.26 y 5.27 muestran la gráfica y la simulación del modelo físico del biorreactor respectivamente para la producción de CO<sub>2</sub> a diferentes tasas de crecimiento ( $\mu_x$ ). Para un valor de  $\mu_x=0.66 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  se observa que la tasa de producción de CO<sub>2</sub> aumenta notablemente alcanzándose la máxima tasa de producción a las 9 h con un valor de 16.87 mg/g<sub>MS</sub> h. De acuerdo a resultados presentados anteriormente, con un valor de  $\mu_x=0.62$  se obtiene la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> a las 10 h con un valor de 14.81 mg/g<sub>MS</sub> h. Así mismo se realizaron simulaciones con valores menores para  $\mu_x$ , en estos casos se observó un comportamiento contrario a los anteriores, es decir, la curva se ensancha considerablemente y disminuye la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> obteniéndose la máxima

tasa de producción a las 17 h para una  $\mu_x=0.32$  ( $\text{h}^{-1}$ ) y a las 22 h para un valor de  $\mu_x=0.23$  ( $\text{h}^{-1}$ ) con valores de 9.29 y 6.58  $\text{mg/g}_{\text{MS}} \text{ h}$  respectivamente. En este sentido tanto la productividad como la tasa de producción se ven afectadas por el cambio en el valor de  $\mu_x$ , estas simulaciones nos ayudan a evaluar la sensibilidad del modelado en la determinación del efecto que tiene un cambio en el valor de un parámetro en específico.



**Figura 5.26.** Perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> a diferentes tasas de crecimiento ( $\mu_x$ )



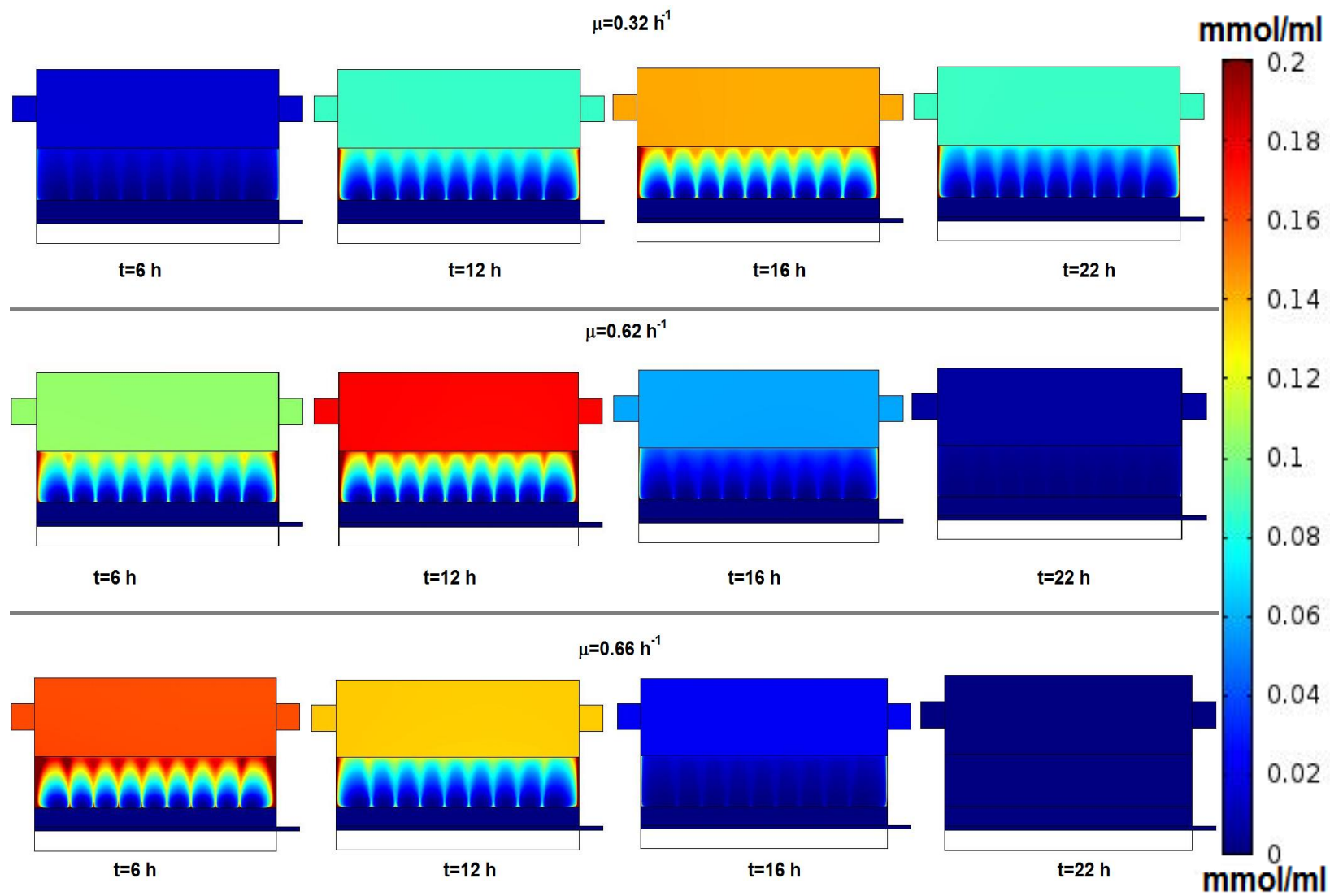


Figura 5.27. Perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  a diferentes tasas de crecimiento

## 6. CONCLUSIONES

Se seleccionó al acrílico como el material de construcción del biorreactor que se construyó en piezas desmontables.

El difusor de aire permite una distribución homogénea de la aireación en el lecho empacado. La distribución de los puertos de muestreo y el acoplamiento de los sensores permitió caracterizar la superficie interna del biorreactor.

El diseño de una cámara de colecta de gases independiente al cuerpo del biorreactor representó una gran ventaja para la cuantificación global y más precisa de los niveles de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ .

Los estudios en un medio abiótico permitieron evaluar el efecto de la hidrodinámica en el transporte de masa y calor. Así mismo se determinaron experimentalmente parámetros importantes (Coeficiente de dispersión,  $D/uL$ ; Capacidad calorífica,  $C_p$ ; Conductividad térmica,  $k$ ; densidad real de sólido  $\rho$ , fracción vacía del lecho; entalpía de reacción,  $\Delta H_R$ ) que sirvieron como referencia en las simulaciones en COMSOL.

El biorreactor de charolas construido es un sistema adecuado para realizar procesos de FMS.

Mantener el biorreactor completamente sumergido en el sistema de calentamiento resultó en un control eficaz de la temperatura, evitando la condensación dentro del sistema.

Una dilución del gas  $\text{CO}_2$  a una proporción de 1:2 es suficiente para obtener el perfil completo de producción de  $\text{CO}_2$  en sus puntos más altos.

La medición en línea de producción de  $\text{CO}_2$  fue muy importante ya que a partir de estos datos fue posible calcular los rendimientos tanto de consumo de sustrato como de producción de biomasa y se determinó la exotermicidad de la reacción mediante el cálculo de la entalpía de reacción a partir del uso de correlaciones empíricas de la reacción para el crecimiento de *Y. lipolytica*.

El modelado de la hidrodinámica del biorreactor mediante CFD permitió identificar zonas muertas donde el transporte de momento se ve afectado en las regiones próximas a las paredes del sistema. El acoplamiento de las ecuaciones de transporte de masa y energía al modelo hidrodinámico permitió obtener el perfil de concentración de oxígeno así como la

distribución de la temperatura en las diferentes zonas del biorreactor y a través del lecho. Se obtuvieron los perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  para describir el crecimiento microbiano mediante la integración del modelo cinético en el esquema de simulación del biorreactor como un sistema de reacción.

El uso de paquetes computacionales como herramienta ingenieril en la simulación de procesos que implican reacciones químicas y/o biológicas en sistemas de reacción es de gran ayuda en el diseño de biorreactores ya que nos da una idea sobre el comportamiento que el equipo tendría a diferentes condiciones de operación haciendo posible evaluar el efecto de parámetros específicos en el rendimiento global del sistema.

## 7. PERSPECTIVAS

Evaluar el grado de desgaste de las juntas de neopreno, ya que la exposición continua a altas temperaturas y humedad puede afectar en la elasticidad de las juntas y consecuentemente la pérdida de firmeza.

Elaboración de un manual del usuario del biorreactor que describa detalladamente la forma correcta de armarlo y que especifique el torque recomendado para los tornillos que unen los módulos del biorreactor con el fin de evitar fracturas en la estructura del equipo.

Evaluación del efecto de la aireación superficial sobre los mecanismos de transporte en el lecho empacado del biorreactor.

Optimización de las variables de operación para la producción de proteasas por *Y. lipolytica* en FMS.

Determinación de los perfiles de transporte de momento, calor y masa del biorreactor a mayores escalas mediante simulaciones en COMSOL considerando ambos sistemas, biótico y abiótico.

Obtención de nuevas simulaciones en COMSOL considerando un modelo tridimensional del biorreactor para lograr una mejor aproximación al sistema real.

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ali, M. & Mahmoodzadeh, B. 2009. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. *Chem. Eng. and Proc.* 48:446.
2. Aranda C., Robledo A., Loera O., Contreras-Esquivel J.C, Rodríguez R. and Aguilar C.N. Fungal Invertase Expression in Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 229–233 (2006).
3. Ashley V.M, Mitchell D.S, Howes T. (1999). Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 3 (1999) 141-150.
4. 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.
5. Bellon-Maurel, V.; Orliac, O.; Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, Volume 38, Number 6, 31 January 2003, pp. 881-896(16).
6. Bird R. B, Steward W. E, Lightfoot E. N. (2010). *Fenómenos de Transporte*. Segunda edición. Editorial: Limusa Wiley.
7. 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.
8. Casas Godoy, Leticia, Georgina Coral Sandoval Fabián "Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales" *Revista Digital Universitaria [en línea]*. 1 de noviembre de 2014, Vol. 15, No.12
9. Casciatori F.P, Laurentino C.L, Lopes K.C, de Souza A.G & Thoméo J.C. (2013). Stagnant Effective Thermal Conductivity of Agro-Industrial Residues for Solid-State Fermentation. *International Journal of Food Properties*, 16:1578–1593, 2013.
10. Castañeda S., Laura M., Aceves D., Angel E. (2012). Producción Biotecnológica De Lipasas Microbianas, Una Alternativa Sostenible Para La Utilización De Residuos Agroindustriales. *Vitae*.
11. Celestino S.M, Maria de Freitas S, Javier Medrano F., Valle de Sousa M., Filho E.X. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *J Biotechnol.* 2006 May 3;123(1):33-42. Epub 2005 Dec 7.
12. Chen H. (2013). *Modern Solid State Fermentation*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. Pages 185-195. . ISBN 978-94-007-6043-1 (eBook).
13. 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.

14. Clough, R.W. (1960). The finite element in plane stress analysis. Proceedings of the second ASCE Conference on Electronic Computation, Pittsburgh, PA, September.
15. Correia R.T.P, McCue P, Magalhaes M.M.A, Macedo G.R and Shetty K. (2004). Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*. 39: 2167-4902.
16. Cristian D. Bahl, María C. Gely y Ana M. Pagano. (2012). Patrones de flujo en reactores químicos: desarrollo de modelos matemáticos y numéricos basados en CFD. *Mecánica Computacional Vol XXXI*, págs. 49-68.
17. Cruz Díaz M. (2005). Estudio hidrodinámico de un biorreactor de lecho escurrido para la remoción de isopropanol. Tesis Maestría. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana.
18. Donea, J. (1992). Méthode d'éléments finis pour les problèmes de convection-diffusion. *Revue Européenne des Éléments Finis*; 1(3):225-252. (in French).
19. Durand A. (2003). Bioreactor design for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13:113-125.
20. Farias M.A, Valoni E., Castro M.A., Coelho M.A. (2014). Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid State Fermentation Using Different Agro Industrial Residues. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 301-306
21. Figueroa-Montero A. (2011). Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un bioreactor de charolas para fermentación en medio sólido. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana
22. 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.
23. Fogler H. S. (2001). *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*, Tercera Edición. Editorial: Person Educación.
24. Foumeny E. and Ma J. 1994. Non-Darcian Non-Isothermal Compressible Flow and Heat Transfer in Cylindrical Packed Beds. *Chem. Eng. Technol.* 17, 50-60.
25. Galanakis, C.M. "Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications". *Trends in Food Science & Technology*. 2012, Vol. 26, no. 2, pp. 68–87
26. Gervais P., Marechal P.A. and Mollin P. (1996). Water relations of solid state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 55: 347-357.
27. 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.
28. Heniche M., Tanguy P.A. (2008). Finite Element Modeling of Viscous Mixing: A Review. *Chemical Product and Process Modeling*, 3:1-54.

29. Hermoso, J. A. et al. "The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family". *Journal of molecular biology* [en línea]. 2004, Vol. 338, no. 3, pp. 495–506.
30. Hernández M.R, Sancho–Solano R., Loera–Corral O., Rojo–Domínguez A., Regalado–González C., Huerta–Ochoa S. and Prado–Barragán L.A., Purification and characterization of a thermostable alkaline protease produced by *Yarrowia lipolytica*. *Rev. Mex. Ing. Quím* vol.10 no.2 México ago. 2011.
31. 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.
32. Hwang, C.H and Gunasekaran S. (2003). Specific heat capacity measurement. In: *Encyclopedia of agricultural, Food and biological engineering.* (ed. D.R. Heldman). Marcel Dekker, New York, NY, pp. 927-935.
33. INEGI. Censo Nacional de Gobiernos Municipales y Delegacionales, 2013. Módulo 6. Residuos Sólidos Urbanos. México. [<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=21385>].
34. Jara H.R, Pradilla M.A, Burgos C.V., (2001). Biorreactores: Modelos Matemáticos y su Simulación sobre una Hoja Electrónica. *Revista Ingeniería e Investigación* No. 48. Colombia
35. Johnvesly, B. and G.R. Naik, 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem.*, 37: 139-144.
36. Jou R.Y, C.-T. Lo. (2011) Heat and Mass Transfer Measurements for Tray-Fermented Fungal Products. *Int J Thermophys* 32:523–536
37. Juarez-Luna (2014). Efecto de la agitación sobre la producción e CO<sub>2</sub> por hongos septados (*Aspergillus versicolor*) y no septados (*Rhizopus microsporus*) en cultivo en medio sólido. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
38. 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
39. Krasnopolskaya, T.S., Meleshko, V.V., Peters, G.W.M., Meijer, H.E.H. (1999). Mixing in Stokes flow in an annular wedge cavity. *European Journal of Mechanics - B/ Fluids*; 18(5): 793-822
40. Laukevics J.J, Apsite A.F., Viesturs U.E. and Tengerdy R.P. (1984). Solid substrate fermentation of wheat atraw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1465-1474.
41. Levenspiel. (2004). *Ingeniería de las reacciones químicas.* Mexico: Limusa Wiley. 3ed.
42. Lian G, A. Thiru, Andrew Parry, Steve Moore. (2002) CFD simulation of heat transfer and polyphenol oxidation during tea fermentation, *Computers and Electronics in Agriculture*, Volume 34, Issues 1–3, Pages 145-158, ISSN 0168-1699

- 
43. Loannis Arvanitoyannis. (2008). *Waste Management for the Food Industries*, 1st Edition. Food science and technology, International series. Pp. 569-619, 703-752. Volos, Greece.
  44. 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.
  45. Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. and Banerjee U. C. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1:1-9.
  46. Margarita Ros; J.A. Pascual; Miguel Ayuso; Ana Belén Morales; Jose Ramón Miralles; Carlos Solera. (2012). Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortalizas: proyecto Life+ Agrowaste. CEBAS-CSIC, CTC y AGRUPAL. España.
  47. MARÍN, F.R., et al., "By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres". *Food Chemistry* [en línea]. 2007, Vol. 100, no. 2, pp. 736–741.
  48. Mendoza J.C, Kulich E.I. (2004). Aplicación de balances de masa y energía al proceso de fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*. *Biotecnología Aplicada* v 21, 85-91.
  49. Mirabella, N., Castellani, V. and Sala, S. "Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review". *Journal of Cleaner Production* [en línea]. 2014, Vol. 65, pp. 28–41.
  50. 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
  51. 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.
  52. 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.
  53. 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.
  54. 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.
  55. Mofteh O.A., Grbavčić S., Žuža M., Luković N., Bezbradica D., Knežević-Jugović Z. (2012). Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 166:348–364.



- 
56. Nagel F.J.L., Tramper J., Bakker M.S.N. and Rinzema A. (2001). Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72:219-230.
  57. 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.
  58. 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.
  59. Nardi I.R, Zaiat M, Foresti E. (1999). *Bioprocess Engineering* No.21. 469-476. Springer-Verlag.
  60. Ochoa-Estopier A., Guillouet S.E., (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidativemetabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 170 (2014) 35– 41
  61. 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.
  62. Pandey A. (1991). Aspects for design of fermenter in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 26: 355-361.
  63. Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27:109-117.
  64. Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 81-84.
  65. Pandey A., Selvakumar P., Soccol C. and Nigam P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77:149-162.
  66. Papageorgiou J. and Froment G. 1995. Simulation models accounting for radial voidage profiles in fixed-bed reactors. *Chemical Engineering Science*, Vol. 50, No. 19, pp. 3043-3056.
  67. 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.
  68. Porcayo-Loza (2014). Producción y aplicación en campo de conidios del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
  69. Ragheva Rao KSMS, Gowthaman MK, Ghildyal NP, Karanth NG (1993) *Bioprocess Eng* 8: 255–262.
  70. Rahman. (1995). *Food Properties Handbook*. New York: CRC Press.
  71. Raimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Elec. J. Biotechnol.* 1: 1-15.
  72. Raimbault M. and Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 199-209.
  73. Rajagopalan S. and Modak J. M. (1995). Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process in try bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 13:161-169.

- 
74. Rajagopalan S. and Modak J.M. (1994). Heat and mass transfer simulation studies for solidstate fermentation processes. *Chem. Eng. Sci.* 49:2187-2193.
  75. Reed, T.B. (1985). .Private Communication, Solar Energy Research Institute
  76. Ricardo C.M y Sanchez C.L. Simulación de un biorreactor de lecho fijo a escala industrial. (2012). *Tecnología química* Vol. XXXII, No. 1.
  77. Rojas V.A., García P. A. (2009). Modelación de la curva de distribución del tiempo de residencia en un sistema de lixiviación industrial. *Tecnología Química Edición Especial*, 2009.
  78. Ruíz-Leza H. A., Rodríguez-Jasso R. M., Rodríguez-Herrera R., Contreras-Esquivel J.C. and Aguilar C. N. (2007). Bio-reactors desing for solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6:33-40.
  79. Sahir, A.H., Kumar, S. & Kumar, S. 2007. Modelling of a packed bed solid-state fermentation bioreactor using the N-tanks in series approach. *Biochem. Eng. J.* 35:20-28.
  80. 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.
  81. 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.
  82. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. México. *BioTecnología*, Año 2012, Vol. 16 No. 2
  83. Silman R.W. (1980). Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 411-420.
  84. 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.
  85. Singh R.P. and Heldman D.R. (1993). *Introduction to food engineering*. Second Edition. Ed. Academic Press London UK. pp: 139-142.
  86. 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.
  87. 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.
  88. Steele R. (2000). *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Woodhead publishing limited. CRC Press. Boca Raton, FL. USA
  89. Stockar U., Liu J.S. (1999). Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. *Biochimica, Biophysica Acta* 1412 (1999) 191-211.

- 
90. Sugama S. and Okazaki N. (1979). Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. *J. Ferment. Tech.* 57: 408-412.
  91. Szewczyk K.W. (1993). The influence of heat and mass transfer on solid state fermentation. *Acta Biochem. Pol.* 40: 90-92.
  92. Tanaka H, Ishikawa H, Osuga K, Takagi Y. Fermentative ability of *Zymomonas mobilis* under various oxygen supply conditions in batch culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering (Japan)*. 1990; 69:234-239.
  93. Thanapimmentha A, Luadsongkram A, Titapiwatanakun B & Srinophakun P (2012) Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Ind. Crops Prods.* 37(1): 1-5.
  94. Bonnin E., A. Le Goff, R. Korner et al., "Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1526, no. 3, pp. 301–309, 2001.
  95. Tillman, D.A. (1978). *Wood as an Energy Resource*, New York: Academic Press.
  96. Toledo R.T. (1994). *Fundamentals of food process engineering*. 2nd Edition. Ed. Chapman & Hall New York USA. pp: 233-238.
  97. 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.
  98. Vereda Alonso C., Gómez Lahoz C., García Herruzo F. y Rodríguez Maroto J. M. (2006). Producción de biogás a partir de residuos vegetales (I). España. Dpto. de Ingeniería Química. Universidad de Málaga.
  99. Weber F.J., Oostra J., Tramper J. and Rinzema A. (2002). Validation of a model for process development and scale-up of packed solid-state reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:381-393.
  100. Weber, F.J., Tramper, J. & Rinzema, A. 1999. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packedbed reactor. *Biotech. Bioeng* 65:447
  101. 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.
  102. Workman M., Holt P., and Thykaer J. (2013). Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express* 2013, 3:58.
  103. Wylen G.J and Sonntag R.E. (1985), *Fundamentals of Classical Thermodynamics*, Section 5.5 (3rd edition), John Wiley & Sons Inc. New York. ISBN 0-471-82933-1
  104. Yepes, S. M., Montoya Naranjo, L. J. y Orozco Sánchez, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales (frutas) en Medellín y el sur del valle del aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 61(1) 4422-4431

105. Zheng, Z and Shetty, K. (1998), Solid-State Production of Beneficial Fungi on Apple Processing Wastes Using Glucosamine as the Indicator of Growth, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46 (2), pp 783–787.