

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS E HIDRAULICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA
FERMENTACION SOLIDA DE LA YUCA:
ENRIQUECIMIENTO PROTEICO Y
CONSERVACION POR ENSILAJE

TESIS QUE PRESENTA:

JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

CONTRIBUCION A ENRIQUECIMIENTO Y CONSERVACION POR ENSILAJE DE LA YUCA:
PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE MAESTRO EN INGENIERIA QUIMICA.

NOVIEMBRE DE 1987

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERIA QUIMICA

PRESENTA

JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
Ingeniero de Alimentos

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:

Presidente: Dr. JORGE H. GARCIA ORIZCO (Asesor)
Secretario: Dr. SERGIO REYAN MOISEEV (Asesor)
Vocal 1 : Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ
Vocal 2 : Dr. SEVASTIANOS ROUSSOS
Vocal 3 : Dr. ENRICO MARTINEZ SAENZ

MEXICO, D.F., NOVIEMBRE 1987.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS E HIDRAULICA

AREA DE INGENIERIA QUIMICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FERMENTACION SOLIDA DE LA YUCA:
ENRIQUECIMIENTO PROTEICO Y CONSERVACION POR ENSILAJE

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERIA QUIMICA

PRESENTA

JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
Ingeniero de Alimentos

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:

Presidente: Dr. JORGE H. GARCIA OROZCO (Asesor)
Secretario: Dr. SERGIO REVAH MOISEEV (Asesor)
Vocal 1 : Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ
Vocal 2 : Dr. SEVASTIANOS ROUSSOS
Vocal 3 : Dr. ENRICO MARTINEZ SAENZ

MEXICO. D.F., NOVIEMBRE 1987.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología de la UAM-I dentro del marco de cooperación con el ORSTOM (Francia) y el ICIDCA (Cuba), así en primer lugar quiero agradecer al Grupo de Investigación en Fermentación Sólida de la UAM-I la ayuda brindada para la elaboración de este estudio.

En forma particular quiero agradecer el interés de Sergio en la revisión final de los textos, así como la disposición de Jorge para la terminación de este trabajo.

Igualmente valiosa fue la discusión de Mariano y Felipe en los aspectos de modelamiento, así como la valiosa ayuda de Luis Pablos en el análisis estadístico.

En la parte práctica de este trabajo fue muy importante la cooperación y entusiasmo de Gilles, Pedro, Rual, Luz y Elisa.

Debo agradecer también a Ruben y Hortensia su ejemplo de dedicación y entrega al trabajo.

Gaby gracias por tu apoyo y paciencia durante todo este tiempo.

Gracias por la ayuda amistosa de todos los compañeros y colegas de la UAM que de alguna manera participaron en la realización de este trabajo.

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FERMENTACION SOLIDA DE LA YUCA: ENRIQUECIMIENTO PROTEICO Y CONSERVACION POR ENSILAJE

Gerardo Saucedo Castañeda

	INDICE DEL CONTENIDO	i
	RESUMEN	iv
	INDICE DE FIGURAS	vi
	INDICE DE TABLAS	viii
1.	INTRODUCCION	1
2.	ANTECEDENTES	
2.1	Generalidades de la Fermentación en Sustrato Sólido (FSS)	4
2.2	La yuca como sustrato de la FSS	5
2.2.1	Importancia de la yuca	5
2.2.2	Valor nutritivo de la yuca	5
2.2.3	Toxicidad de la yuca	6
2.2.4	Oportunidades para conservar y mejorar el valor nutritivo de la yuca	7
2.3	Ensilaje y fermentación láctica	8
2.4	Cultivo sólido de hongos filamentosos	11
2.5	Modelos cinéticos de fermentaciones	16
2.5.1	Fermentación láctica	16
2.5.2	Cultivo de hongos filamentosos	20
2.6	Diseño de bioreactores de FSS	24
2.7	Antecedentes directos a este trabajo	27
2.8	Objetivo de este trabajo	27
3.	METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	
3.1	Ensilaje	29
3.1.1	Bacterias lácticas	29
3.1.2	Agar y medio Rogosa	29
3.1.3	Condiciones iniciales de ensilaje	30
3.1.4	Ensilaje de yuca fresca	30
3.1.5	Ensilaje de yuca seca	31
3.1.6	Microsilos de laboratorio	32

3.1.7	Prototipos para medir perfiles de temperatura ...	32
3.1.8	Tratamiento de muestras	33
3.2	Enriquecimiento proteico	34
3.2.1	Hongos filamentosos	34
3.2.2	Medio de conservación de hongos	34
3.2.3	Medio de esporulación de hongos	34
3.2.4	Medio de crecimiento de hongos	34
3.2.5	Prototipos para medir perfiles de temperatura CO ₂ y O ₂	35
3.2.6	Tratamiento de muestras	35
3.3	Técnicas analíticas	35
3.3.1	Tinción de Gram	35
3.3.2	Peso seco	35
3.3.3	Acidez total titulable (ATT) y pH	35
3.3.4	Acido láctico (Determinación colorimétrica)	36
3.3.5	Azúcares reductores libres	36
3.3.6	Azúcares totales	36
3.3.7	Acidos nucleicos	36
3.3.8	Proteína verdadera	36
3.3.9	Cromatografía de gases	36
3.3.10	Medición de temperatura	36
3.3.11	Determinación de CO ₂ y O ₂	36
4.	SIMULACION DE UN REACTOR DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO	
4.1	Descripción del problema	41
4.2	Evidencia experimental	42
4.2.1	Cinética de CO ₂ , O ₂ y temperatura	42
4.2.2	Perfiles radiales y axiales de temperatura	43
4.3	Planteamiento del modelo teórico	43
4.3.1	Modelo cinético	43
4.3.1.1	Dependencia del crecimiento con la temperatura ..	44
4.3.2	Modelo de transporte	46
4.4	Comprobación del modelo	48
4.5	Discusión del modelo desarrollado	51
4.6	Conclusión	53
5.	USO DE BACTERIAS LACTICAS EN EL ENSILAJE DE YUCA	
5.1	Comparación de tres tipos de ensilaje	62
5.2	Selección de cepa y estabilidad del silo	65
5.3	Estudio del tamaño de inóculo	65
5.3.1	Acidogénesis	66
5.3.2	Patrón fermentativo	68

5.3.3	Consumo de sustrato	69
5.3.4	Rendimientos aparentes	69
5.3.5	Evaluación del crecimiento	69
5.4	Efecto de la composición y factores ambientales	71
5.4.1	Efecto del pH y tamaño de partícula	71
5.4.2	Efecto de la adición de calcio, nitrógeno y fibra	72
5.4.3	Correlación de pH y acidez total titulable	75
5.5.	Efecto de la temperatura	77
5.5.1	Acidogénesis	77
5.5.2	Patrón fermentativo	78
5.5.3	Consumo de sustrato	79
5.5.4	Evaluación de crecimiento	80
5.6	Conclusión	80
6.	SIMULACION Y ESCALAMIENTO DEL ENSILAJE	
6.1	Simulación del ensilaje	89
6.2	Escalamiento del ensilaje	93
6.3	Conclusión	95
7.	CONCLUSION GENERAL	101
8.	REFERENCIAS	104
 A P E N D I C E S		
I	CLASIFICACION, METODOLOGIA Y ESTIMACION DE PARAMETROS EN MODELOS	113
II	MEDIOS DE CULTIVO Y TECNICAS ANALITICAS	118
III	PROGRAMAS DEL MODELAMIENTO DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO	128
IV	DATOS DE EFECTO DE COMPOSICION	161
V	DATOS DE ESCALAMIENTO DE ENSILAJE	164

RESUMEN

Este trabajo plantea la fermentación en medio sólido como una alternativa viable para la utilización de materiales amiláceos, concretamente para contribuir a solucionar los problemas de aprovechamiento de la yuca (*Manihot esculenta*), debido a: i) su bajo contenido de proteínas y ii) su perecibilidad.

La fermentación en medio sólido es un proceso donde la actividad microbiana se lleva a cabo en toda la masa cuyo contenido de humedad oscila entre 50 y 75 por ciento dependiendo del tipo de material empleado. El enriquecimiento protéico de la yuca con *Aspergillus niger* y el ensilaje adicionado de *Lactobacillus casei* presentan alternativas importantes para solucionar los problemas de aplicación de la raíz.

La orientación de este trabajo se basa en el estudio de ambas fermentaciones desde un punto de vista de bioingeniería, es decir se trata de hacer una síntesis de aspectos microbiológicos e ingenieriles.

Los antecedentes previos de estos dos procesos fueron diferentes, en la parte de enriquecimiento protéico se contaba con un amplio trabajo microbiológico, mientras que en el caso del ensilaje los estudios previos fueron de naturaleza aplicada en nutrición animal, existiendo pocos reportes microbiológicos.

En la parte de enriquecimiento protéico este estudio realizado fue la continuación de trabajos anteriores. Es decir, se planteó y comprobó un modelo matemático para la simulación de la generación y transferencia de calor de la fermentación en medio sólido, acoplado intrínsecamente al abalace de masa, encontrando que el mecanismo de transporte de calor es esencialmente conductivo.

Este modelo pseudohomogéneo, unidimensional y dinámico, permite la predicción del crecimiento, el consumo de sustrato, la formación de CO_2 y la elevación de la temperatura dentro del bioreactor. El modelo sirve de base para:

- a) Escalamiento del proceso basado en números adimensionales (Peclet y Biot), además con algunas modificaciones es posible aplicar el modelo a bioreactores con diversas geometrías y con agitación.
- b) Control del proceso fermentativo siendo posible su extensión a otros sistemas de microorganismos y sustratos donde el producto de la fermentación sea valioso.

Con el trabajo anterior se logró un avance novedoso y original en el campo del modelamiento de las fermentaciones sólidas de hongos filamentosos.

En lo referente al ensilaje de yuca el trabajo se dividió en dos etapas, una microbiológica y otra de simulación y escalamiento donde los puntos sobresalientes fueron:

a) Estudios microbiológicos del ensilaje

Se estableció la metodología microbiológica de estudio del ensilaje de yuca que permitió determinar que la adición de inóculos pequeños (1 %, V:P) de *Lactobacillus casei* favorece que la fermentación siga un patrón homoláctico mejorando notablemente la calidad bioquímica del ensilaje.

En el estudio de diversos aspectos de la fermentación del ensilaje se encontró que en un rango amplio (5-8) de pH inicial la fermentación se lleva a cabo exitosamente, mientras que diámetros de partícula mayores a 3 mm perjudican el desarrollo de la fermentación.

Estudios nutricionales indicaron que la adición de cloruro de calcio y sulfato de amonio al ensilaje no favorece la formación de ácido láctico, sin embargo la adición de bagazo de caña incrementa el nivel final de ácido posiblemente por la mayor capacidad de retención de agua y suplementación de azúcares.

Se determinó una correlación empírica de pH contra acidez total titulable, útil para llevar a cabo el seguimiento de ensilaje homoláctico bajo condiciones reales.

b) Simulación y escalamiento del ensilaje

La cinética de acidificación del ensilaje se simuló en función del tamaño de inóculo y de la temperatura mediante la aplicación del modelo de Gompertz y usando al ácido láctico como única variable.

Por otro lado, se determinó que hasta un nivel de 100 kg la fermentación homoláctica y heteroláctica no desprende el suficiente calor para elevar la temperatura de la masa significativamente. En este sentido se recomienda realizar estudios en el lugar donde se presentan los problemas de calentamiento del ensilaje.

Finalmente respecto al ensilaje se logró un avance muy importante en el conocimiento y aplicación de la fisiología de lactobacilos en medio sólido, permitiendo establecer un modelo sencillo para simular la cinética de acidificación.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS E HIDRAULICA

AREA DE INGENIERIA QUIMICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FERMENTACION SOLIDA DE LA YUCA
ENRIQUIMIENTO PROTEICO Y CONSERVACION POR ENZIMAS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERIA QUIMICA

PRESENTA

JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
Ingeniero de Alimentos

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:

Presidente: Dr. JORGE H. GARCIA ORTEGO (Asesor)
Secretario: Dr. SERGIO REVAH MIZSEV (Asesor)
Vocal 1: Dr. GUSTAVO VIRREGA GONZALEZ
Vocal 2: Dr. SEVASTIANOS RUSSEOS
Vocal 3: Dr. ERIC MARTINEZ BARRON

MEXICO, D.F., NOVIEMBRE 1987.

INDICE DE FIGURAS

Fig 3.1 Microsilos de laboratorio. (a) Capacidad 500 g, (b) capacidad 50 g y (c) dispositivo de incubación de los microsilos de 50 g.	38
Fig. 3.2 Dispositivo experimental para la determinación de perfiles axiales de temperatura en la fermentación sólida de la yuca, con 1 l de capacidad, 6 cm de DI y 35 cm de altura.	39
Fig 3.3. Dispositivo experimental para la determinación de perfiles radiales de temperatura en la fermentación sólida de la yuca, con 1 l de capacidad, 6 cm de DI y 35 cm de altura.	40
Fig. 4.1 Evolución de CO ₂ , O ₂ y Coeficiente respiratorio (CR) a la salida del reactor (a). Aumento de temperatura a la salida de fermentador (b).	54
Fig. 4.2 Perfiles axiales de temperatura a diferentes alturas del bioreactor (a). Variación axial de temperatura a diferentes tiempos (b). Diferencias máximas observadas en el reactor (c).	55
Fig. 4.3 Perfiles radiales de temperatura en el tiempo de fermentación.	56
Fig. 4.4 Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento del cultivo sólido (Tomado de M. Raimbault (1980)..	56
Fig. 4.5 Máxima Tasa de crecimiento (u) en función de la temperatura. Modelo (----).	57
Fig 4.6 Comparación de temperaturas experimentales y calculadas en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4., (a) COND5 y (b) COND19.	58
Fig 4.7 Simulación del crecimiento microbiano en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4, (a) COND5 y (b) COND19.	59
Fig 4.8 Simulación del consumo de sustrato en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4, (a) COND5 y (b) COND19.	60
Fig 4.9 Simulación de la producción de CO ₂ en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4, (a) COND5 y (b) COND19.	61
Fig. 5.1 Cinética de acidez total titulable (a) y pH (b) en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con <i>Lactobacillus casei</i>	82

Fig. 5.2 Cinética de azúcares reductores residuales en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con <i>Lactobacillus casei</i>	83
Fig 5.3 Variación de los rendimientos aparentes de sustrato a producto en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con <i>Lactobacillus casei</i>	84
Fig 5.4 Variación del crecimiento expresado en ácidos nucleicos en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con <i>Lactobacillus casei</i>	84
Fig 5.5 Correlación del pH y la Acidez Total Titulable para el ensilaje de yuca adicionado de <i>Lactobacillus casei</i>	85
Fig 5.6 Variación de la relación ácido láctico/lactato en el ensilaje de yuca adicionado con <i>Lactobacillus casei</i> en función de la Acidez Total Titulable (a) y del pH del medio (b).	86
Fig 5.7 Cinética de acidez total titulable (a) y pH (b) del ensilaje de yuca en función de la temperatura, adicionado de 10 % V:P de <i>Lactobacillus casei</i>	87
Fig 5.8 Variación del contenido de azúcares reductores en el ensilaje de yuca a diferentes temperaturas, adicionado de 10 % V:P de <i>Lactobacillus casei</i>	88
Fig. 6.1 Dependencia de la cinética del ensilaje de yuca con el tamaño de inóculo (% V:P) de <i>Lactobacillus casei</i> (+ Datos experimentales, - Modelo Gompertz).	97
Fig 6.2 Dependencia de la cinética de acidificación con la temperatura (°C), en el ensilaje de yuca adicionado de <i>Lactobacillus casei</i> . (+ Datos experimentales, - Modelo Gompertz). ..	98
Fig 6.3 Dependencia de la constante específica de acidificación del modelo de Gompertz con la temperatura (+ Datos experimentales, - Modelo Arrhenius).	99
Fig 6.4 Gradientes de temperatura observados entre el centro y la pared del bioreactor, a diferentes niveles (kg) de escalamiento del ensilaje de yuca.	100
Fig 6.5 Gradientes de temperatura observados entre el centro y la pared del bioreactor, en el ensilaje realizado con yuca fresca y yuca seca a nivel de 40 kg.	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Microorganismos empleados para la producción de alimentos por FSS.	12
Tabla 3.1 Tamaño de partícula de la yuca seca empleado en los diferentes ensayos experimentales.	31
Tabla 3.2 Dimensiones características del escalamiento de silos.	33
Tabla 4.1 Estimación de μ en función de la temperatura para el crecimiento de <i>A. niger</i> en yuca.	44
Tabla 4.2 Crecimiento máximo al final de la fermentación de <i>A. niger</i> en yuca en función de la temperatura.	46
Tabla 4.3 Valores de los parámetros ajustados para las variaciones del modelo durante su comprobación.	50
Tabla 4.4 Estimación de los parámetros del modelo final en dos juegos de datos experimentales.	51
Tabla 5.1. pH al final del ensilaje con diferentes tratamientos	63
Tabla 5.2 Análisis de los productos de la fermentación del ensilaje con diferentes tratamientos.	63
Tabla 5.3 Comparación de los metabolitos producidos en el ensilaje con <i>L. casei</i> , flora natural y adición de ácido inorgánicos.	64
Tabla 5.4 Características cinéticas principales del ensilaje a diferentes niveles de inoculación.	68
Tabla 5.5 Incremento de metabolitos producidos durante el ensilaje a diferentes niveles de inoculación.	68
Tabla 5.6 Valores finales y máximos de incremento de ácidos nucleicos en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación.	70
Tabla 5.7 Efecto de pH inicial en el ensilaje de yuca a 72 horas de fermentación.	71
Tabla 5.8 Efecto del tamaño de partícula en el ensilaje de yuca a 72 horas de fermentación.	72
Tabla 5.9. Coeficientes codificados de la regresión multi-	

lineal en base a materia seca total.	74
Tabla 5.10 Coeficientes codificados de la regresión multi- lineal en base a yuca seca inicial.	74
Tabla 5.11 Análisis de medias de la producción final de ácido láctico en el ensilaje de yuca adicionado con fibra a 10 y 15 % base seca.	75
Tabla 5.12 Efecto de la temperatura en las cinéticas de pH y ácido láctico en el ensilaje de yuca inoculado con <i>L.</i> <i>casei</i>	78
Tabla 5.14 Incremento de metabolitos en el ensilaje de yuca inoculado con <i>L. casei</i> en función de la temperatura.	79
Tabla 5.15 Valores finales y máximos de incremento de ácidos nucleicos en el ensilaje de yuca inoculado con <i>L. casei</i> e incubado a diferentes temperaturas.	80
Tabla 6.1 Resultados de la estimación de parámetros del mode- lo de Gompertz aplicado a la cinética de ensilaje en función del inóculo y la temperatura.	91
Tabla 6.2 Resultados de la estimación de parámetros del mode- lo mecanístico aplicado a la cinética de ensilaje en función del inóculo y la temperatura.	91
Tabla 6.3 Efecto del tamaño de inóculo y la temperatura en la concentración máxima de ácido láctico observada y calculada por el modelo de Gompertz.	92

CAPITULO 1. INTRODUCCION

La escasez de alimentos y el crecimiento acelerado de la población mundial hacen necesario un aprovechamiento racional de los recursos alimentarios existentes y así como la disminución de pérdidas desde la producción hasta el consumo.

En la actualidad existe en México un programa de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) para impulsar el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta*) y cubrir la demanda alimentaria del sector pecuario con miras a disminuir el consumo de granos forrajeros.

En 1984, la SARH estimó la existencia de 300 000 Ha de tierras marginadas que podrían cultivarse con yuca, en 1986 se reporta una producción de 25 000 ton en la zona de Humanguillo, Tabasco. Además existen otros programas encaminados a la utilización integral de este cultivo.

La raíz de la yuca, es un tubérculo que puede ser empleado en diversas formas para consumo humano, animal e industrial. Además existen varios factores que permiten la expansión de este cultivo.

En 1972 a nivel mundial, 420 millones de personas suplían el 50 % de sus requerimientos calóricos con yuca, sin embargo su utilización se ve limitada principalmente por tres factores:

- A) Bajo contenido protéico (1-2%) y un valor nutritivo inferior a muchos cereales y leguminosas.
- B) Problemas de conservación en forma húmeda. Con frecuencia se presenta descomposición durante su ensilaje y los costos de secado son altos debido a la alta humedad relativa de los climas tropicales donde se cultiva. Las pérdidas postcosecha de productos agrícolas se estiman en general entre un 20 y 30%, en el caso de la yuca esta pérdida puede deberse a problemas de manejo y a desviaciones de la fermentación en el ensilaje.
- C) Toxicidad por el contenido de glucósidos cianogénicos. El consumo de la yuca con un elevado contenido de cianuro puede causar envenenamiento y la muerte .

Previo a la explotación del potencial que representa la yuca, es necesario resolver los problemas que limitan su aprovechamiento, en este sentido la fermentación en sustrato sólido (FSS) presenta las siguientes soluciones:

- i) La fermentación láctica del ensilaje conserva los tubérculos de yuca en forma húmeda.

ii) La acidificación que se produce en el ensilaje causa la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos (linamarina y lotaustralina) liberando el HCN y detoxificando la raíz.

iii) El crecimiento de hongos filamentosos sobre la yuca aumenta el nivel protéico de 6 a 8 veces.

Las tres alternativas anteriores se pueden llevar a cabo mediante dos fermentaciones sólidas, el ensilaje y el enriquecimiento protéico.

En el ensilaje y el enriquecimiento protéico se emplean diferentes microorganismos y condiciones de cultivo, comparándose en forma general de la siguiente manera:

FACTOR	ENSILAJE	ENRIQUECIMIENTO PROTEICO
Microorganismo	Bacterias lácticas	Mohos
Medio ambiente	Anaerobio	Aerobio
Vel crecimiento	Alta	Baja
Fase retardo	Corta	Largo
Producto	Acido láctico	Biomasa
Vía metabólica	Glucolisis	Respiración
Finalidad	Conservación	Enriquecimiento

El ensilaje de la yuca es un proceso de conservación que industrialmente se lleva a cabo en grandes volúmenes (1 000 ton). El requerimiento de anaerobiosis hacen que el proceso se lleve a cabo en sistemas cerrados, además su bajo valor agregado solo permiten controlar la fermentación a través de las condiciones iniciales y mediante el diseño del bioreactor.

El enriquecimiento protéico es un proceso en desarrollo aunque existen industrias japonesas automatizadas que pueden fermentar hasta 20 ton de Koji. El alto valor agregado de sus productos justifica que se lleve a cabo el control de este proceso abierto, con una complejidad tecnológica mayor a la del ensilaje y que ofrece la oportunidad de regular la fermentación a través de las condiciones de operación y el régimen de agitación.

Por otra parte, los estudios de ensilaje realizados por veterinarios y zootecnistas han sido en forma esencial de carácter aplicado y enfocado a la alimentación animal, existiendo también pocos estudios de orientación microbiológica que han sentado las bases bioquímicas del ensilaje. Sin embargo no se conocen estudios desde un punto de vista de bioingeniería que podrían llevar a trazar lineamientos generales sobre un control apropiado del ensilaje en grandes volúmenes.

Respecto al enriquecimiento protéico, en la actualidad existe un grado de avance importante en los aspectos microbiológicos básicos y se realizan esfuerzos para el diseño eficiente de este tipo de fermentadores, siendo los modelos matemáticos una herramienta sumamente útiles en el diseño de bioreactores.

En este trabajo se muestra la aplicación de algunos aspectos de bio-ingeniería en el enriquecimiento protéico y el ensilaje de yuca, orientados a resolver las limitantes de su aprovechamiento con dos líneas de estudio:

a) En lo referente al enriquecimiento protéico se contribuye al diseño adecuado de bio-reactores mediante el planteamiento y comprobación de un modelo matemático, haciendo especial énfasis en los problemas de transferencia y generación de calor.

b) Respecto al ensilaje se presentan los resultados de un estudio microbiológico básico orientado a determinar las condiciones adecuadas para conservar la yuca y se analizan aspectos sobresalientes de la simulación de la cinética y el escalamiento.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la Fermentacion en Sustrato Solido (FSS)

La fermentación en sustrato sólido (FSS), se ha propuesto como una alternativa a las tecnologías actualmente usadas para el aprovechamiento de productos agrícolas primarios.

Este proceso está relacionado con la utilización de material húmedo a través de la actividad de hongos y bacterias, es decir que la fermentación se lleva a cabo en toda la masa húmeda.

Este proceso no debe ser confundido con el cultivo superficial y una forma general de definir el medio sólido en el campo de las fermentaciones, es que se trata de un material orgánico húmedo no suspendido en agua, que permite el desarrollo de la fermentación deseada. Los niveles de humedad van desde 12 (donde la actividad biológica cesa) hasta 80 por ciento aproximadamente, dependiendo del nivel máximo de retención de agua del material que se emplee como sustrato (Hesseltine, 1972; Knapp, 1978; Raimbault, 1980; Moo Young, et. al., 1983).

Existen cuatro procesos de FSS que han sido empleados en la actualidad:

- a) Alimentos fermentados orientales
- b) Quesos madurados
- c) Composteo
- d) Ensilaje

Los productos de la FSS incluye la formación de biomasa, enzimas, ácidos orgánicos y algunos metabolitos secundarios, empleando microorganismos y materiales previamente seleccionados (Moo Young et al, 1983).

Existen ventajas y desventajas en el uso de la fermentación sólida (Moo-Young, et. al., 1983; Hesseltine, 1972; Knapp, 1978 y Bailey & Ollis, 1977):

Ventajas	Desventajas
* Requiere menos energía	* Problemas de transferencia de calor y masa
* Reduce el volumen de reactor	* Pretratamiento del sustrato
* Productos concentrados que facilitan extracción	* Control difícil
* Pocos efluentes	* Requiere mucha mano de obra
* Poco control del proceso	* Requiere inóculo muy alto
* Rendimientos altos	* Posibilidad de contaminación

Ya que la FSS tiene ventajas y desventajas es necesario un estudio sistemático para cada aplicación, esto requiere de la integración de un grupo interdisciplinario Biotecnológico para la investigación, desarrollo, adaptación, transferencia y

difusión de la tecnología de interés.

Es necesario hacer notar que en este trabajo se emplea el concepto de FSS de una manera muy amplia, relacionándolo tanto con el ensilaje como con el enriquecimiento protéico, sin embargo debe reconocerse que en la literatura este proceso (FSS) esta íntimamente relacionado con el cultivo de hongos filamentosos.

2.2 La yuca (*Manihot esculenta*) como sustrato de la FSS

El material utilizado en este estudio es yuca y dada su importancia se revisarán algunos conceptos.

2.2.1 Importancia de la yuca

La yuca es originaria de Sudamérica, del sur y oeste de México, y desde hace 2000 años se ha adaptado a latitudes dentro de una franja que va de 30' al sur y norte del Ecuador, a elevaciones no mayores de 2000 m sobre el nivel del mar, en temperaturas de 10 a 25 °C, con precipitaciones de 50 a 5000 mm anuales, en suelos pobres con pH de 4 a 9 (Pursglove, 1968; Kay, 1973; Phillips, 1974).

Aunque la yuca es originaria de América el 40 por ciento de la producción mundial proviene de África (Okigbo, 1980).

La yuca se puede usar para consumo humano, alimentación animal y uso industrial en diversas formas, destacándose el ensilaje de yuca para alimentación animal. Además existen diferentes razones que han propiciado la rápida expansión del cultivo de la yuca (Okigbo, 1980):

- i Se adapta a suelos pobres
- ii Resiste la sequía y el ataque de la langosta
- iii Se propaga fácilmente por resiembra de trozos de tallo
- iv Tiene una productividad relativamente alta (75 ton/Ha).
- v El cultivo es barato

Además consume los mismos nutrientes del suelo que otros cultivos como la caña de azúcar, maíz y naranja.

2.2.2 Valor nutritivo de la yuca

La yuca es el producto con mayor proporción de carbohidratos después de la caña de azúcar. Se ha reportado que la yuca puede producir hasta 250 000 cal/Ha/día comparado con 176 000 del arroz, 110 000 del trigo y 200 000 del maíz y 114 000 del sorgo. La composición química de la yuca varía en las diferentes partes de la planta, y de acuerdo a la variedad, localización, edad, método de análisis y condiciones ambientales (De Vries, 1967; Coursey y Haynes, 1970; Phillips, 1974).

Aunque las raíces de la yuca son muy ricas en calorías, son

severamente deficientes en proteínas (1-2 %), grasas (0.5 %) y en algunos minerales y vitaminas. Consecuentemente la yuca tiene un valor nutritivo menor que los cereales y las leguminosas, y hasta que algunas otras raíces. El perfil de aminoácidos es pobre en lisina, metionina y triptofano.

Del 64 al 72 por ciento de la yuca es almidón, en la forma de amilosa y amilopectina. En las variedades dulces hay 17 por ciento de sacarosa y poca cantidad de glucosa y fructosa (Hendershot, et al 1972; Senez, 1979).

La cáscara de la yuca contiene un poco más de proteína que la pulpa, por lo que el pelado conduce a una disminución del contenido de proteína. Sin embargo la fermentación de la yuca puede llevar consigo un aumento en el contenido proteico en un factor de 6 a 8 (Senez, 1979; Raimbault y Alazard, 1980).

La yuca es razonablemente rica en calcio y vitamina C, pero los contenidos de Tiamina, Riboflavina y Niacina son bajos, además durante el procesamiento se pierde proporciones altas de estos compuestos.

Las hojas de la yuca son ricas en proteínas, pero con menos metionina que las raíces, los niveles de los demás aminoácidos esenciales exceden la referencia de la FAO (1977). Por esta razón la proteína de la hoja de yuca se puede llamar superior a la proteína de la soya, sin embargo la suplementación de metionina en los productos de yuca es una práctica extendida (Adegbola, 1977).

2.2.3 Toxicidad de la yuca

La yuca contiene glucósidos cianogénicos en la forma de linamarina (93 por ciento), y lotoaustralina (7 por ciento). El contenido de los glucósidos cianogénicos varía con las partes de la planta, edad, variedad y condiciones del suelo (humedad y temperatura). Algunas variedades de yuca han sido clasificadas como dulces o amargas, debido a su íntima relación con el contenido de glucósidos cianogénicos. Las variedades dulces tienen un contenido de HCN menor que las amargas (Okigbo, 1980).

Los indios americanos consumidores de yuca conocían las propiedades tóxicas de la raíz desde hace cientos de años. El consumo de la yuca y otros alimentos con contenido elevado de cianuro pueden causar envenenamiento y muerte en el hombre y otros animales.

Coursey y Haynes (1970) han sugerido una clasificación de la yuca en base a su contenido de HCN. En el rango de 50 a 100 mg de HCN/kg de raíz fresca pelada se cataloga desde inocua hasta peligrosamente venenosa, respectivamente. Este mismo autor observó que niveles menores a 30 ppm HCN corresponden a las

variedades dulces y niveles de hasta 480 ppm para las muy amargas.

El consumo de productos de yuca con un nivel no tóxico de cianuro por períodos muy largos dan como consecuencia una toxicidad crónica.

Diversos estudios han relacionado el consumo de yuca con ciertas condiciones patológicas y enfermedades tales como neuropatía atáxica tropical (NAT) y el bocio endémico.

Osuntokun, reporta la incidencia de NAT, consistente en lesiones múltiples del sistema nervioso, en áreas con elevado consumo de la raíz y con niveles altos de tiocianato.

Ekpechi y Delange, reportan la incidencia de bocio endémico, no asociado a la deficiencia de yodo, sino íntimamente relacionado con elevados consumos de yuca seca, ahumada y sin fermentar, confirmandose que la yuca interfiere con la asimilación de yodo por la tiroides.

2.2.4 Oportunidades para conservar y mejorar el valor nutritivo de la yuca

La toxicidad de la yuca ha guiado a diversos métodos de detoxificación para minimizar el peligro del cianuro, en general son métodos de tratamiento con soluciones, ebullición o fermentación (Coursey y Haynes, 1970; Collard y Levi, 1959).

Sefa-Debeh (1984), ha reportado que durante la elaboración de un producto tradicional a base de yuca llamado gari, ocurre una primera etapa de detoxificación por la hidrólisis de la linamarina al disminuir el pH durante la fermentación, como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos por *Corynebacterium manihot* (Collard y Levi, 1959). Lo cual muestra la posibilidad de emplear la fermentación láctica en medio sólido como una alternativa al proceso de detoxificación y conservación de la yuca en fresco.

En México existen oportunidades para elevar el valor nutricional de la yuca, mejorando directamente las variedades de cultivo en los diferentes programas de producción (Appan et al 1980; SARH, 1984). Recientemente se han desarrollado metodologías para el enriquecimiento proteico de la yuca (Raimbault, 1980), además existen estudios para aprovechar el potencial del cultivo a través del beneficio integral de hojas y raíces (Cruz, 1984) y la reducción del contenido de glucósidos cianogénicos.

2.3 Ensilaje y fermentación láctica.

El ensilaje se engloba dentro de las fermentaciones en sustrato sólido y a manera de definición para este trabajo, y en base a McCullough (1977), se deberá entender por ensilaje la conservación del material (orgánico alimentario) húmedo por la acidificación anaerobia debido a la acción de microorganismos. De esta manera se excluye la aplicación del término para otros usos como almacenamiento de granos y cereales, conservación de productos húmedos por la adición de ácidos orgánicos e inorgánicos (U. Nebraska, 1978), o en general el almacenamiento de cualquier material en una construcción denominada silo.

El principal propósito del ensilaje es la conservación del material con una pérdida mínima de nutrientes y energía, aunque también se le han atribuido ciertos beneficios como un mejora en balance de aminoácidos (Sharpe, 1981).

Se conocen 5 tipos de patrones fermentativos que pueden llevarse a cabo en el ensilaje: láctico, acético, propiónico, butírico y marchitamiento (McCullough, 1977 y Doelle, 1975). Sin embargo como se verá más tarde, la fermentación láctica es la más apreciada.

Los factores importantes para la realización y éxito del ensilaje son (McCullough, 1977; Whittenburg, 1961):

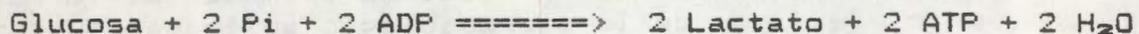
- Contenido de humedad (66-72 %)
- Poca capacidad amortiguadora del medio
- Disponibilidad de carbohidratos solubles (6-8 %)
- Predominancia de bacterias lácticas homofermentativas
- Alta velocidad de fermentación
- Bacterias ácido tolerantes para producir un pH menor a 4

La fermentación láctica en el ensilaje es la vía metabólica que más disminuye el pH del medio, debido a su bajo pK (3.84), además le confiere al producto propiedades organolépticas aceptables (McCullough, 1977; Fleig, 1938).

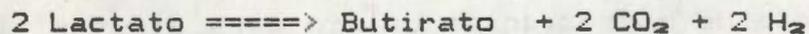
La fermentación láctica puede seguir dos vías metabólicas obteniéndose diferentes proporciones de productos finales, así por ejemplo, la fermentación homoláctica, por la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) produce más de 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa consumida, mientras que la fermentación heteroláctica, vía hexosa monofosfato (HMP), produce una proporción menor de ácido láctico además de etanol y CO₂, con la consiguiente pérdida de nutrientes y energía (Rose, 1977; Doelle, 1975).

		% RECUPERACION	
		CARBONO	ENERGIA
FERMENTACION LACTICA	Homolactica (EMP) Glucosa ==> 2 Lactato	100.0	93.1
	Heterolactica (HMP) Glucosa ==> Lactato + Etanol + CO ₂	91.6	94.9

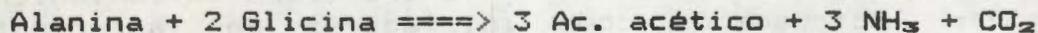
Durante la fermentación homoláctica se sigue la siguiente reacción global:



Si la formación de ácido láctico es lenta o la cantidad de ácido insuficiente, se favorece el desarrollo de clostridios butíricos, ya que el lactato es usado como sustrato para la fermentación butírica a la vez se eleva el pH favoreciendo el desarrollo de clostridios, dando lugar a problemas posteriores de aceptación. La pérdida de nutrientes conduce a una disminución en el material fermentado de 51 por ciento y pérdidas de energía del 18 por ciento (McCullough, 1977):



Además se pueden presentar otros patrones metabólicos relacionados con la degradación de proteínas, o reacciones acopladas de oxidación-reducción relacionadas con la desaminación de aminoácidos, dando lugar a la liberación de dióxido de carbono y amoníaco.



Con el deterioro de proteínas y el aumento de la capacidad amortiguadora del medio, la cantidad de carbohidratos requeridos para llevar el pH a 4 se incrementa. Este problema no se presenta en la yuca debido a su bajo contenido protéico.

Se ha demostrado que los microorganismos no desaminan aminoácidos a valores de pH menores de 4, además a pH 4-5, la acción de clostridios se ve seriamente inhibida (McCullough, 1977).

De la estequiometría básica de los procesos bioquímicos se sabe que por cada mol de etanol o ácido acético se forma una mol de CO₂, lo cual lleva a una pérdida de materia y energía y una liberación mayor de calor al medio. Además se sabe que la liberación y recuperación de energía en la glucólisis son relativamente bajas, 4.72 y 6.85 por ciento respectivamente, sin embargo el proceso fermentativo es mucho más rápido que el respiratorio.

En términos prácticos estos principios básicos implican que si la fermentación en el ensilaje no se controla hacia un patrón homoláctico, los problemas de calentamiento pueden llegar a ser importantes, hecho que coincide con la elevación de temperatura observada en silos de yuca de grandes dimensiones (Zaragoza, 1984). Este calentamiento puede llegar a detener la fermentación antes de que se alcance un pH suficientemente bajo para lograr la conservación del material.

Diversos autores han estudiado el ensilaje de material forrajero, desde un punto de vista de la microbiología aplicada (Ruxton y McDonald, 1974; Ohayama, Masaki y Hara, 1975; Ohyama, Morichi y Masaki, 1975), otros más desde un punto de vista práctico (Vandergerten y Vanstallen, 1979), o desde un punto de vista nutricional (Pathak, Mohan y Ranjhan, 1974; Shimada, 1981; Castrillón, Shimada y Calderón 1978), abundando así la información desde un punto de vista práctico.

Por otra parte, Pozo (1983), encuentra que en la fermentación láctica de la harina de yuca enriquecida es importante considerar:

- a) La presencia de hidróxido de calcio para ajustar el pH.
- b) La presencia de celulosa como material de soporte y reservorio de humedad. Además, se confirma que el ensilaje se puede llevar a cabo satisfactoriamente en niveles de humedad del 60 a 70 por ciento.
- c) El tipo de inóculo empleado.

Hasta principios de ésta década no era claro la conveniencia de emplear lactobacilos como iniciadores de la fermentación láctica del ensilaje (Sharpe, 1981), sin embargo varios autores han estudiado la aplicación de lactobacilos en el ensilaje de diversos de materiales tanto de origen animal como vegetal. En ocasiones no se encontró beneficio en la inoculación (Ely et. al., 1982; Moon et. al., 1981 y Ohyama et. al., 1975), pero en otros casos se observó que la adición de lactobacilos provoca una disminución mayor del pH, un aumento en la producción de ácido láctico y disminución de ácidos grasos volátiles (Flores et. al., 1985; Lindgren et. al., 1983; Moon, 1981; y Van Wik et. al., 1985) dando lugar a un producto más apetecible para los animales de acuerdo a los criterios expuestos anteriormente por Flieg (1938).

Aparentemente el éxito del uso de lactobacilos en el ensilaje reside en la carga bacteriana inicial del material (Moon, 1981; y Van Wik et al, 1985), así como de las condiciones en que se lleve a cabo el ensilaje (McCullough, 1977), en sí cada sistema de ensilaje requiere una exploración sistemática para la selección del microorganismo adecuado.

Las bacterias lácticas se dice que son fermentadoras obligadas ya que sólo obtienen energía de la fosforilación del

sustrato carbonado, y en términos bioquímicos estrictos cumple con la definición de fermentación. Las bacterias lácticas son cocos o bacilos gram positivos, no esporulados, siendo desde anaerobios facultativos hasta anaerobios estrictos, con requerimientos nutricionales estrictos (Doelle, 1975 y Sharpe, 1981).

El estudio de la fisiología de lactobacilos tiene una larga tradición y se ha demostrado que la fermentación láctica presenta inhibición por producto final (Rogers y Whittiers, 1928), esto es, que la fermentación se ve inhibida por la molécula no disociada de ácido láctico más que por ningún otro compuesto, aparentemente afectando a la fosfofructoquinasa que es la primera de las once enzimas que intervienen en la glucólisis (Lehninger, 1975).

La fermentación láctica ha sido ampliamente estudiada en cultivo sumergido por diversos autores, usando cultivos puros (axénicos) de microorganismos y en general se reporta que bajo condiciones de pH controlado, el pH óptimo de fermentación esta entre 5 y 6; los medios de cultivo son ricos y las relaciones de C/N menores a 4 (Luedeking y Piret, 1959; Hanson y Tsao, 1972; Keller y Gerhardt, 1975; Rogers, et. al., 1978). Por otra parte usando también cultivo sumergido pero con inóculos mixtos (no-axénicos) diversos autores reportan que es posible orientar el patrón fermentativo hacia un perfil homoláctico a través de la manipulación de temperatura, pH y composición de la fuente nitrogenada; con medio de cultivo más pobres y relaciones C/N alrededor de 30 (Torre de la I. y Goma, 1980; Gómez y Viniegra-González, 1981; Pipyn y Verstraete, 1981, Gómez y Coronado-Vega, 1983).

2.4 Cultivo solido de hongos filamentosos

Como se indicó anteriormente, el cultivo de hongos filamentosos es el proceso que se ha relacionado con mas frecuencia con la denominación generalizada de FSS, y en este respecto se revisará el avance del conocimiento científico e ingenieril en esta área.

Los hongos filamentosos obtienen energía por el Ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, formando 36 moléculas de ATP netos por mol de glucosa consumida, estos compuestos de alta energía son la base de la biosíntesis del micelio. La respiración se puede representar esquemáticamente de la siguiente manera:



con la liberación de 639 kcal/ mol de glucosa.

A pesar de que se conocen los principios bioquímicos de esta fermentación, el refinamiento y automatización del proceso se

ha desarrollado principalmente en países orientales. Por otra parte se conocen pocos trabajos o revisiones de la literatura donde se analicen aspectos de ingeniería en este campo de las fermentaciones (Lonsane et al, 1985).

Los hongos filamentosos que se emplean en la FSS para la producción de biomasa, pueden ser agrupados en tres clases (Moo Young et al, 1983):

- a) Ficomicetos: *Mucor* y *Rhizopus*
- b) Ascomicetos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*
- c) Basidiomicetos: Hongos comestibles

En la Tabla 2.1 se enuncian algunos de los microorganismos usados en la FSS para la producción de alimentos.

Tabla 2.1 Microorganismos empleados para la producción de alimentos por FSS

Microorganismo	Proceso	Referencia
<i>Rhizopus oligosporum</i>	Tempen	Hesseltine, 1972
<i>Aspergillus niger</i>	Biomasa de yuca	Raimbault & Alazard, 1980
<i>Aspergillus niger</i>	Biomasa de yuca	Carrizales et al 1981
<i>Penicillium roqueforti</i>	Maduración queso	Gray, 1970
<i>Trichoderma reesei</i>	Biomasa de pasto	Han & Anderson, 1975
<i>Trichoderma lignorum</i>	Biomasa de paja	Viestur et al, 1981
<i>Trichoderma harzianum</i>	Biomasa de bagazo	Roussos, 1985
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Biomasa de papel	Barnes et al, 1972
<i>Chaetonium cellulolyticum</i>	Biomasa de paja maíz, estiércol	Moo Young et al, 1979 Pamment et al, 1978
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Biomasa de pasto	Han & Anderson, 1975

Los procesos Koji, Raimbault y Waterloo utilizan cultivos puros de microorganismos para mejorar el control de la utilización del sustrato y la formación de producto final (Moo Young et. al., 1983).

El proceso Koji, se lleva a cabo en charolas o camas, de 7 a 12 cm de espesor, donde se hace crecer el hongo sobre un sustrato previamente acondicionado, en un ambiente de humedad, temperatura y aireación controladas. Este proceso ha sido modificado y adaptado para la producción de amilasa en la producción de

alcohol (Moo Young et. al., 1983).

El proceso diseñado por Rimbault (1980) utiliza un bioreactor cilíndrico de lecho fijo donde el hongo crece sobre una matriz de gránulos húmedos de almidón de yuca gelatinizados, matriz que es a la vez el soporte y el sustrato. A través de la columna se hace pasar aire previamente humedecido y calentado, dando lugar a un producto hasta con 20 % de proteína en base seca (Rimbault, 1980). Esta metodología se ha empezado a usar para explorar su aplicación en productos más valiosos.

Finalmente, el proceso Waterloo produce proteína unicelular a partir de material celulósico y se puede obtener un producto hasta con 35 % de proteína (Moo Young et. al. 1983)

Cada proceso de FSS requiere de una pareja adecuada de microorganismo y sustrato para obtener el producto deseado.

El crecimiento de los hongos filamentosos se lleva a cabo en forma apical alargándose las hifas fúngicas, sin embargo se presentan cambios en la morfología de acuerdo al sistema de cultivo.

En el cultivo sumergido agitado y aireado, el crecimiento se presenta en forma de esférulas, con crecimiento apical en la parte exterior de la esférula. En cultivo superficial, como en una caja de Petri, el crecimiento es apical pero en dos dimensiones sobre la superficie del agar.

En la FSS el crecimiento es apical, pero la dirección depende de la disponibilidad de nutrientes y de la configuración geométrica de la matriz sólida. Así inicialmente se presenta un crecimiento apical superficial, posteriormente hay un ataque hacia el interior de los gránulos de almidón, y finalmente una invasión de los espacios libres entre los gránulos de sustrato, de esta manera simplificada se puede apreciar la complejidad del proceso durante el crecimiento microbiano.

Debido a la heterogeneidad del medio, existe una dificultad técnica importante para medir experimentalmente el crecimiento en forma precisa, así los métodos con que se cuenta actualmente no son del todo adecuados (Ácidos nucleicos, proteína verdadera). Existen otros métodos tal vez más precisos pero sin embargo su aplicación es complicada (radioisótopos, ATP) (Aiba et al, 1978).

El crecimiento de los hongos y su metabolismo en la FSS esta sujeto a los mismos fundamentos bioquímicos y leyes físicas que un cultivo sumergido. Sin embargo la aplicación de los controles prácticos de la fermentación es mucho más difícil, ya que comunmente los controles se basan en la

composición del gas, el mezclado del medio, la disponibilidad de nutrientes, la relación superficie volumen y los factores ambientales como temperatura, pH y humedad.

Las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono en el ambiente son factores críticos para el crecimiento y la formación de productos en la FSS (Bajrachaya & Mudgett, 1980), de tal forma que se pueden usar mezclas de O_2 y CO_2 para regular la fermentación.

El mezclado es un factor usado en conexión con la aireación para introducir nuevas superficies de aireación, sin embargo, produce rompimiento del micelio y consecuentemente un daño celular y disminución del crecimiento.

Los factores nutricionales pueden ser limitantes para el crecimiento balanceado en la FSS, esta situación es especialmente importante en este medio donde la difusión de nutrientes es lenta.

El diseño de los bio-reactores de fermentación ha avanzado poco por la dificultad que existe para hacer medidas experimentales confiables a las variables importantes del proceso, ya que la heterogeneidad del medio dificulta la determinación precisa de la biomasa, nutrientes, pH y temperatura.

El paso limitante en la transferencia de masa en la FSS puede residir en la difusión inter o intrafase.

La transferencia de masa interfase es muy importante para el transporte de oxígeno desde el espacio vacío en el reactor hasta la fase sólida donde crece el microorganismo. Este transporte depende del tipo de sustrato empleado, así como de la humedad del medio, ya que un exceso de humedad puede inundar los espacios vacíos evacuando el aire y causando una disminución del crecimiento del hongo.

Si la fracción vacía es suficientemente grande para soportar el crecimiento, podría no ser necesaria la aireación continua, sin embargo también se requiere desalojar el CO_2 producido, por lo que la aireación continua es necesaria y posiblemente un mezclado suave también es recomendable. El control práctico más efectivo de la transferencia interfase de oxígeno, es medir continuamente los niveles de oxígeno dentro de la masa que está fermentando y tomar las medidas correctivas adecuadas si el nivel de este es muy bajo.

La transferencia de masa intrafase se refiere al transporte de nutrientes y enzimas dentro de la masa de sustrato. Este aspecto se puede analizar haciendo algunas simplificaciones, en forma similar a las pastillas utilizadas como catalizadores químicos, involucrándose el uso de factores de efectividad y módulo de

Thiele, empleados ampliamente en la ingeniería de reactores químicos.

Por otra parte, la transferencia de calor en la FSS esta fuertemente asociada con las tasas de aireación de la mezcla fermentando. La baja humedad del medio establece condiciones difíciles para la transferencia de calor, por lo tanto, el control de temperatura en grandes escalas es muy difícil. Este problema es una de las principales desventajas de la FSS respecto al cultivo sumergido.

La aireación puede ser empleada para calentar o enfriar la masa durante la fermentación de acuerdo a la etapa en que se encuentre el proceso.

El diseño de bioreactores para fermentación sólida ha sido realizado en gran medida en forma empírica y la razón principal de esto, es la ausencia de datos experimentales confiables, así como la falta de sensores adecuados para este sistema de fermentación.

En forma general, existen diferentes diseños de bio-reactores que se han empleado para la FSS: tambores rotatorios, charolas, dispositivos de incubación de geometría cartesiana verticales e inclinados, fermentodares de columna y continuos de canjilones (Lonsane et. al., 1985).

Finalmente se conoce muy poca información acerca de la técnicas de automatización de la FSS, y la mayoría de ellas han sido desarrolladas en Japón y otros países orientales, para la producción industrial de koji y enzimas. Sin embargo, los detalles técnicos no están disponibles en la literatura y son de naturaleza confidencial.

2.5 Modelos cinéticos de fermentaciones

El objetivo primordial del modelamiento en bioingeniería, es el desarrollo de un conjunto de expresiones matemáticas (ecuaciones algebraicas y diferenciales), capaces de describir y explicar el comportamiento de un proceso biológico y que sean útiles dentro de un objetivo concreto. La situación ideal de un modelo es el desarrollo de una expresión general, sin embargo no es fácil, ya que depende de la complejidad del sistema y de la disponibilidad de información. Los sistemas biológicos son complejos y la información es a veces controvertida.

El estudio de la construcción de modelos y estimación de parámetros, fue primeramente realizado con la finalidad de llenar los requerimientos de aplicaciones prácticas de procesos biológicos. Sin embargo, de esta aplicación han surgido preguntas que sólo pueden ser respondidas con una investigación biológica más profunda. La utilidad de los modelos está en conexión con la planeación de los experimentos, y puede ser una herramienta valiosa en la investigación biológica básica, a través de la evaluación cuantitativa de los diferentes postulados bioquímicos (Holmberg y Ranta, 1979).

La complejidad de las expresiones matemáticas puede ser muy amplia, sin embargo, generalmente existe un compromiso entre la complejidad de las expresiones matemáticas y la facilidad para comprobar el modelo.

Los diversos modelos poseen limitaciones y cualidades, que los hacen atractivos en mayor o menor grado, así la aplicación de cada modelo dependerá del objetivo que se persigue. De esta forma los modelos matemáticos usados en fermentaciones son una imagen o una representación sencilla del proceso biológico. El proceso denota una serie de operaciones o tratamientos reales, mientras que el modelo es su descripción matemática.

Uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar y comprobar modelos aplicables a la fermentación láctica y al crecimiento de hongos filamentosos ambos en medio sólido, esto contribuye al conocimiento de la fermentación sólida y del metabolismo microbiano. En esta sección se revisará el avance científico a este respecto.

2.5.1 Fermentación láctica

Debido a la falta de información respecto a la cinética de la fermentación láctica en el ensilaje y a la relativa abundancia de información en cultivo sumergido, a continuación se presentarán los avances más importantes en modelamiento de la fermentación láctica en cultivo sumergido.

El desarrollo de los modelos tiene su base en fundamentos bioquímicos, esto hace pensar que los mismos principios se

conservarán tanto en medio sumergido como en sólido; sin embargo posiblemente sea necesario hacer algunas consideraciones especiales, debido a la dificultad experimental que presenta este último.

La mayor parte de los modelos que se han desarrollado para la fermentación láctica son no estructurados y el trabajo experimental ha sido realizado en cultivo sumergido usando cultivos bacterianos axénicos puros, bajo condiciones de pH y temperatura controlados y usando frecuentemente medios de cultivo complejos, con peptona como fuente de nitrógeno y extracto de levadura como fuente de factores de crecimiento (Luedeking y Piret, 1959; Hanson y Tsao, 1972; Keller y Gerhardt, 1975; Aborhey y Williamson, 1977; Rogers et. al., 1978).

Los primeros estudios de la fermentación láctica en cultivo sumergido indicaron que tanto el pH como el ácido láctico no protonado afectaban fuertemente a esta fermentación (Rogers y Whittiers, 1928) y a partir de estos hechos se empieza a estudiar este fenómeno.

Gran parte de los esfuerzos para desarrollar modelos para simular la fermentación láctica se basa en los trabajos realizados por Luedeking y Piret (1959), empleando *Lactobacillus delbrueckii* NRRL - B 445, incubado a 45 °C. Determinaron que la tasa de formación del ácido láctico a partir de glucosa, depende tanto de la velocidad de crecimiento como de la densidad bacteriana presente, encontrando que:

$$R_p = \frac{dP}{dt} = a \frac{dX}{dt} + b X$$

donde a y b son parámetros dependientes del pH.

Hanson y Tsao (1972), modificando la expresión de Monod (1942) y estableciendo similitud entre las reacciones químicas de primer orden y las fermentaciones, desarrollaron el siguiente modelo:

$$\begin{aligned} R_x &= \frac{dX}{dt} = K_v \frac{S}{K_s - S} X \\ R_s &= \frac{dS}{dt} = - B_s \frac{S}{K_s - S} X \\ R_p &= \frac{dP}{dt} = B_p \frac{S}{K_s - S} X \end{aligned}$$

donde K_v , K_s , B_s y B_p son constantes y debido al signo negativo en la constante de afinidad en la expresión de Monod (1942), cambia de signo el denominador.

La estimación de los parámetros la realizaron a través de la integración y linealización de las ecuaciones diferenciales. Para la integración gráfica y diferenciación de las curvas

cinéticas utilizan el método de Edwards y Wilke (1968).

Mediante este modelo encuentran buenos resultados en la simulación de un cultivo sumergido continuo, sin embargo no explican la razón del signo negativo de la constante de afinidad.

En 1975, Keller y Gerhardt, ensayan la fermentación láctica en cultivo continuo para la producción de proteína cruda para alimentación animal. Utilizan básicamente las ideas de Monod (1942) y Luedeking y Piret (1959), y expresan la tasa específica de crecimiento (k_i) como una función de la concentración del producto:

$$k_i = k_{\max} (1 - P/P_{\max})$$

$$R_x = \frac{dX}{dt} = \frac{k_i S}{K_s + S} X$$

$$R_p = \frac{dP}{dt} = (a k_i + b) \frac{X S}{K_s + S}$$

$$R_s = \frac{dS}{dt} = \frac{(a k_i + b)}{Y} \frac{X S}{K_s + S}$$

donde Y es un factor de rendimiento, a y b son las mismas constantes que en el caso del modelo de Luedeking y Piret (1959), y K_s es la constante de afinidad de Monod (1942). Además encuentran que los valores relativos de a y b , pueden ser usados para calcular las contribuciones relativas del crecimiento y mantenimiento en la producción de ácido láctico.

Rogers, et. al. (1978), trabajando con *Streptococcus cremoris* HP y utilizando a la lactosa como fuente de carbono y sustrato limitante en concentraciones de 0.2 a 5 %, encuentran un modelo conveniente para el cultivo por lote, construido con las ideas de Monod (1942) y de Luedeking y Piret (1959):

$$R_x = \frac{dX}{dt} = k_1 \frac{S}{K_s + S} \frac{K_p}{K_p + P} X$$

$$R_s = - \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt}$$

$$R_p = \frac{dP}{dt} = k_2 \frac{dX}{dt} + k_3 \frac{S X}{K_s + S}$$

donde las k_i son constantes.

Utilizan técnicas de regresión no lineal para la estimación de los parámetros y combinan el criterio de mínimos cuadrados y sencillez de las expresiones para la discriminación del

modelo.

Este modelo no predice la fase de retardo, por lo que es necesario ajustar la escala del tiempo al momento de la simulación. Además no realiza predicciones correctas a altas tasas de dilución en cultivo continuo debido al crecimiento en las paredes que presenta el microorganismo, sin embargo, resulta útil en los estudios de cultivo continuo que realizan posteriormente.

Usando los datos de Rogers et. al. (1978), Aborhey y Williamson (1977) desarrollan el modelo más avanzado de la fermentación láctica en medio líquido, este modelo es estructurado a diferencia de todos los anteriores. Es importante hacer notar que este modelo tal vez sea el único estructurado para la fermentación láctica, y se presenta 12 años después que Tsuchiya et al. (1966) presentan la teoría de los modelos estructurados por primera vez.

Parten simultáneamente de la idea de Monod (1942) y de Luedeking y Piret (1942), consideran que la formación de producto depende de la concentración de sustrato intracelular efectiva (S_i) y que el transporte de sustrato a través de la membrana es el paso controlante del proceso siguiendo una cinética enzimática (K_g). Es decir que la inhibición por producto afecta directamente el transporte de sustrato a través de la membrana. Toman en consideración que la formación de biomasa y producto y el consumo de sustrato están bajo control enzimático (U_x, U_s, U_p).

Para resolver el problema del modelado de la fase de retardo introducen un término de concentración crítica de sustrato (S_t), debajo de la cual no existe actividad y que a tiempo cero tiene un valor de cero. Las ecuaciones que resultan después de su desarrollo son:

$$\begin{aligned} R_x &= \frac{dX}{dt} = U_x X \\ R_p &= \frac{dP}{dt} = U_p X \\ R_s &= \frac{dS}{dt} = -q K_g \frac{S}{K_s + S} X \\ R_{s_i} &= \frac{dS_i}{dt} = \frac{q K_g S}{K_s + S} - \frac{U_x}{Y_x} - \frac{U_p}{Y_p} \end{aligned}$$

donde $S_e = 0$ cuando $S_i < S_t$
y $S_e = S_i - S_t$ cuando $S_i > S_t$

$$U_x = \frac{U_{max} S_e}{S_e + K_{sx}} \quad U_p = \frac{U_{maxp} S_e}{S_e + K_{sp}} \quad K_g = K_o + \frac{K_t S_e}{S_e + K_{st}} \quad q = \frac{S}{S + K_{pP}}$$

Este modelo relativamente complejo predice satisfactoriamente las

diferentes etapas de la fermentación, esto hace pensar que las premisas sobre las que fue fundamentado son correctas. Sin embargo este modelo requirió de un gran esfuerzo en programación para su comprobación.

Existen otro tipo de modelos que por su sencillez han empezado a emplearse en fermentaciones y específicamente en casos en que es difícil medir en forma precisa la biomasa. Este modelo de ley de potencia es similar a los utilizados en reacción química, Bovee et. al. (1984) lo aplicaron para la fermentación alcohólica:

$$R_s = \frac{dS}{dt} = k S P$$

$$R_p = \frac{dP}{dt} = Y_{p/a} \frac{dS}{dt}$$

donde $Y_{p/a}$, a , b y k son constantes.

Por otra parte, para el diseño de fermentadores, es necesario conocer cual es la dependencia de la cinética en función de la temperatura. Para este efecto Esener, Roels y Kosen (1981), desarrollaron una expresión de la velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) en función de la temperatura, usando expresiones combinadas de tipo Arrhenius llegan a predecir el proceso de activación e inhibición de la cinética microbiana en función de la temperatura. La expresión a la que llegan después de su desarrollo es :

$$\mu_{max} = \frac{A \exp(-DH/RT)}{1 + K \exp(-DH'/RT)}$$

expresión similar a la presentada por Kehoe y Butt (1972) para una cinética de hidrogenación de benceno.

2.5.2 Cultivo de hongos filamentosos

En el caso del crecimiento de hongos filamentosos en FSS existe relativamente poca información respecto al desarrollo y aplicación de modelos. Entre los modelos más recurridos están el modelo cúbico, el logístico, el modelo de Okazaki (1980) y un modelo mixto que se puede derivar de las expresiones de Monod, Teissier y Contois (Bailey & Ollis, 1977).

El modelo cúbico se deriva del crecimiento que presentan los hongos filamentosos en forma de esférulas en cultivo sumergido:

$$X = (X_0^{1/3} + a t)^3$$

donde $a = \frac{kg}{P} \left(\frac{6\sqrt{U}}{P} \right)^{2/3}$ $kg = \frac{dr}{dt}$

este modelo es interesante desde el punto de vista de su concepción sin embargo, en la FSS no resulta muy clara su aplicación.

La aproximación general para modelar el crecimiento en un cultivo por lotes es:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = f(T, pH, S, X, \dots)$$

sin embargo, considerar simultáneamente todos los factores que afectan el crecimiento es muy complejo y generalmente los modelos se desarrollan tomando en cuenta un solo factor.

Uno de los modelos más simples es la ley de Malthus:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = u X$$

donde u es una constante.

Por otra parte, existen numerosos de modelos que han sido muy recurridos en Biología, Agricultura, Ingeniería y Economía, los modelos sigmoidales y los asintóticos, expresiones que generalmente son no lineales, en esta sección se revisarán los modelos que pueden tener interés para el área de fermentaciones.

Los denominados asintóticos, son expresiones del tipo:

$$X = A - B G^t$$

donde A , B , y G son constantes, A es el valor máximo que puede tomar el valor de X , con esta expresión se puede representar la formación de cualquier producto.

Otro modelo de esta clase es el modelo desarrollado por Gompertz (Ratkowsky, 1983; Draper & Smith, 1981), que es una variación del modelo logístico pero sin simetría en su punto de inflexión:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = k X \log(A/X)$$

donde A es el valor máximo que alcanza X y k es la tasa específica de reacción. Expresión que se puede integrar para llegar a:

$$X = A \exp(-B \exp(-kt))$$

sin embargo, es importante señalar que existen varias parametrizaciones de este mismo modelo, que posiblemente facilitan

su aplicación.

Finalmente existe otra expresión de tipo mecanístico, sin cambio de curvatura en el perfil que describe y donde la velocidad de formación es proporcional a la cantidad de crecimiento alcanzado a ese momento Draper & Smith, 1981):

$$R_x = \frac{dX}{dt} = k(A - X)$$

donde k es la constante de crecimiento, A es el valor límite del crecimiento. Este modelo se puede integrar, para llegar a:

$$X = A (1 - B \exp(-kt))$$

Por otra parte, los modelos sigmoidales producen curvas en forma de S, empezando en un cierto punto con un crecimiento monótono hasta alcanzar su punto de inflexión, después de lo cual la velocidad de crecimiento decrece para aproximarse asintóticamente a cero. Existen diversas expresiones matemáticas que dan aproximadamente el mismo tipo de curvas y algunas tienen bases teóricas (Ratkowsky, 1983), entre estas expresiones están la logística y las desarrolladas por Gompertz, Richards, Morgan-Mercer-Flodin y Weibull.

De las expresiones sigmoidales, la que ha sido más usada en fermentaciones ha sido la logística, es decir:

$$X = \frac{A}{1 + \exp(B - Ct)}$$

Es interesante saber que existen otras parametrizaciones del modelo logístico, que pueden ser más indicadas para el uso práctico:

$$X = \frac{1}{A + B \cdot C}$$

$$X = \frac{A}{1 + \exp(B) \cdot C}$$

$$X = \frac{1}{A + \exp(B) \cdot C}$$

$$X = \frac{A}{1 + B \exp(-Ct)}$$

$$X = \frac{1}{A + B \exp(-Ct)}$$

La última expresión se ha empleado en fermentaciones y ha tenido algunas interpretaciones teóricas, como que A es el inverso del nivel máximo de crecimiento, B es la relación de biomasa final a inicial y C es la velocidad específica de crecimiento.

Raimbault (1980) utilizó este modelo para caracterizar la cinética de crecimiento de *A. niger* sobre yuca en FSS, que se puede expresar en forma diferencial de la siguiente forma:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = u X \left(1 - \frac{X}{K} \right)$$

donde se aprecia que existe un factor de inhibición poblacional sobre el crecimiento que es proporcional al cuadrado de la biomasa presente. Verlhust en 1844 y Peer y Read en 1920 contribuyeron a la teoría incluyendo este factor de inhibición (Bailey & Ollis, 1977).

Por otra parte, a este modelo se le puede asociar el consumo de sustrato con energía de mantenimiento:

$$R_s = \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} + m X$$

donde Y es un factor de rendimiento y m es la cantidad de energía del sustrato que es consumido por unidad de microorganismo y por unidad de tiempo, para mantener la flora bacteriana viable.

La idea de energía de mantenimiento fue expresada anteriormente por Pirt (1975), debido a los cambios de los rendimientos globales de conversión de sustrato a producto. Este autor demostró que una porción del sustrato total consumido se destina al crecimiento, mientras que otra porción se utiliza para el metabolismo endógeno, que comprende la biosíntesis de macromoléculas estructurales y gasto de energía en el transporte activo.

Edwards y Wilke (1968) desarrollaron una metodología para ajustar los datos experimentales obtenidos de una fermentación por lotes, a una ecuación logística modificada, donde al menos algunos de sus parámetros tienen significado físico.

Basicamente la generalización que hacen de la ecuación logística es la siguiente:

$$X = \frac{A}{1 + \exp(F(t))}$$

donde

$$F(t) = A_0 + A_1 t + A_2 t^2 + A_3 t^3 + \dots$$

A medida que se aumenta el grado del polinomio de F(t), se obtendrán curvas con mayor poder de predicción. Por otro lado A representa el valor de la concentración de células en la fase estacionaria o la concentración máxima de producto obtenido, el parámetro A₁ representa la velocidad máxima

específica de crecimiento o de formación de producto; y A_0 esta involucrada con la relación X_0/X .

De esta forma se cuenta con una representación continua, que es posible diferenciar e integrar de acuerdo a los requerimientos del modelo y es de gran utilidad para la comprobación posterior de los modelos. Esta metodología de Edwards y Wilke, requiere del uso de programas para la estimación de parámetros en modelos no lineales (Marquardt, 1963).

El modelo propuesto por Okazaki (1980), ya ha sido referido anteriormente (Huerta, 1984) y básicamente se trata de un modelo logístico para el crecimiento, estableciendo además una relación de la formación de dióxido de carbono proveniente de la respiración endógena.

Por otra parte, existe una manera de combinar tres modelos distintos en un misma expresión matemática, es decir, los desarrollados por Monod (1942), Moser y Contois (Bailey y Ollis, 1977). Los trabajos de los dos últimos son básicamente variaciones sobre la expresión original de Jacques Monod, que a su vez partió de la consideraciones de Michaelis y Menten (1913), Briggs y Haldane (1925), Chang (1943) y Langmuir (Carberry, 1976):

$$\text{Monod} \quad \frac{dX}{dt} = \frac{U_{\max} S}{K_s + S} X$$

$$\text{Moser} \quad \frac{dX}{dt} = \frac{U_{\max} S^a}{K_s + S^a} X$$

$$\text{Contois} \quad \frac{dX}{dt} = \frac{U_{\max} S}{K_s X + S} X$$

Las expresiones presentadas se pueden combinar de la siguiente manera:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{U_{\max} S^a X}{K_s X^b + S^a}$$

de tal forma que si

- a=1 y b=0 se tiene el modelo de Monod
- a=1 y b=1 se tiene el modelo de Contois
- a=1 y k=0 se tiene el modelo de Moser

Esta generalización de los tres modelos es práctica ya que permite evaluar los tres modelos simultáneamente y seleccionar el más adecuado o una combinación de ellos.

2.6 Diseño de bioreactores de FSS

Los bioreactores de ensilaje y los de enriquecimiento proteico tienen similitud con los reactores químicos de lecho fijo, así

para su estudio se puede hacer uso del avance en este ramo de la ingeniería química.

Los aspectos sobresalientes de ingeniería de estas dos fermentaciones de sustrato sólido son:

<u>FERMEN-</u> <u>TACION</u>	<u>REGIMEN</u>	<u>TIPO DE</u> <u>REACTOR</u>	<u>T MASA</u>	<u>T CALOR</u>	<u>POSIBILIDADES</u> <u>DE DISEÑO</u>
<u>ENSILAJE</u>	Lote	Estático Empacado Heterogéneo	Despre- ciable	Difusión	Cond inicial Dim y geometría
<u>ENRIQUE-</u> <u>CIMIENTO</u>	Lote	Est y/o Din Emp y/o Agit Heterogéneo	Conv-Dif	Conv-Dif	Cond inicial Dim y geometría Cond operación

Se deben tomar en cuenta algunas consideraciones, por ejemplo, en el caso de FSS el producto de interés permanece en el lecho, mientras que en los reactores químicos el proceso es continuo, lo cual lleva a diseños especiales en el reactor para este proceso intermitente.

Un punto importante en las reacciones bioquímicas es que el proceso de fermentación o su producto normalmente son muy termolábiles, por lo que en ocasiones es importante evitar que la temperatura del medio exceda un cierto valor.

Los modelos matemáticos pueden ser usados como herramienta en el diseño racional de bioreactores de FSS, y este punto de vista es el usado en esta parte del trabajo.

Los modelos usados para describir los reactores catalíticos de lecho empacado se pueden clasificar en dos grandes categorías (Froment, 1972):

M O D E L O S

Dimensión	Pseudo-homogéneos	Heterogéneos
Una	Flujo pistón (FP) FP + mezclado axial	FP + Gradientes interpartícula FP + Gradientes inter e intrapartícula
Dos	FP + mezclado axial y radial	FP + Gradientes inter e intrapartícula y mezclado radial

De los modelos mencionados, los que se pueden emplear para la FSS son los bidimensionales tanto pseudo homogéneos como heterogéneos, recordando que los procesos fermentativos son intermitentes y dependientes del tiempo, lo cual aumenta

considerablemente la complejidad de las expresiones matemáticas del modelo.

El avance del conocimiento teórico y práctico de la fermentación sólida y la complejidad del fenómeno obligan por el momento, al uso de modelos pseudo homogéneos que involucren constantes globales de transporte.

Existe una gran deficiencia de modelos matemáticos para la FSS (Lonsane et. al., 1985), y en este sentido sólo se han hecho algunos intentos para modelar algunos aspectos de la transferencia de calor y masa (Lonsane et. al., 1985 y Singer et. al., 1976). Debido a la sensibilidad de los microorganismos a la temperatura, uno de los problemas más serios en la FSS es la disipación de calor del sistema y por considerarlo un aspecto crítico en este trabajo, se enfocará únicamente dicho problema y la revisión de los modelos se hará en este sentido.

De trabajos anteriores (Huerta, 1984), se sabe que los gradientes de temperatura en la dirección radial son importantes para bioreactores cilíndricos de FSS mientras que el gradiente de temperatura en la dirección axial es relativamente menor.

Por otra parte, de la teoría de reactores catalíticos se sabe que la dispersión axial se puede despreciar si la relación de longitud a diámetro de partícula es mayor a 100 - 150 (Carberry, 1976 y Froment 1972), situación que se puede dar en la FSS.

La forma general de un modelo pseudo homogéneo temporal y bidimensional en geometría cilíndrica, que considera gradientes de temperatura radiales y un mezclado ideal en la dirección axial y despreciando la dispersión en la dirección axial y angular, puede expresarse de la siguiente forma:

$$PCp \frac{dT}{dt} = k \left(\frac{d^2T}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dT}{dr} \right) + UPCp \frac{dT}{dt} + P (-AH) R_x$$

con condiciones iniciales: $T = T_0$

y condiciones de frontera:

$$\frac{dT}{dr} = 0 \quad @ \quad r = 0 \quad \text{y} \quad \frac{dT}{dr} = - \frac{h}{k} (T - T_w) \quad @ \quad r = R_0$$

y $T = T_0 \quad @ \quad Z = 0$

que es la ecuación de continuidad de energía térmica para un reactor cilíndrico de lecho fijo.

Esta ecuación general es susceptible a sufrir algunas simplificaciones, por ejemplo en el caso del ensilaje, por

llevarse a cabo en un medio anaerobio no existe el término de convección por aireación. En el caso del enriquecimiento protéico, bajo ciertas condiciones, es posible desprestigiar el perfil axial de temperatura. Estas simplificaciones pueden ayudar a la comprobación de algún modelo de transporte de este naturaleza.

2.7 Antecedentes directos a este trabajo

Debido a su alto contenido de almidón la yuca encierra una gran cantidad de energía importante para la alimentación animal y humana, siendo un cultivo importante en el área de Huimanguillo, Tabasco, donde en 1986 se produjeron 25 000 toneladas. El aprovechamiento del tubérculo requiere de dos factores importantes:

- a) Conservación
- b) Aumento del contenido de proteínas

Respecto al primero, algunos autores han realizado estudios de ensilaje con diversos materiales encontrando que la adición de bacterias lácticas puede ser un factor muy importante para orientar favorablemente el ensilaje, obteniendo un producto de mejor calidad para la alimentación animal. Los estudios realizados por veterinarios y zootecnistas sobre el ensilaje de yuca han estado enfocados de manera esencial hacia la producción animal.

Para el caso especial del ensilaje de yuca se ha puesto poca atención en los aspectos bioquímicos y de ingeniería, siendo que la conservación del material y el control de la fermentación depende en forma importante de estos factores.

En lo segundo, el cultivo de hongos filamentosos puede aumentar el contenido protéico de diversos materiales, entre ellos la yuca, teniendo este proceso una complejidad tecnológica superior a la del ensilaje. El cultivo de *A. niger* en yuca ha sido estudiado desde puntos de vista microbiológicos y de algunos aspectos de ingeniería, además de que se han diseñado empíricamente algunos prototipos de biorreactores agitados y estáticos.

La complejidad del proceso de enriquecimiento protéico, la falta de sensores adecuados y la heterogeneidad del medio no han permitido comprobar modelos matemáticos que contribuyan al entendimiento del proceso y al diseño de biorreactores adecuados.

2.8 Objetivo de este trabajo

En este trabajo pretendemos contribuir a la aplicación de algunos conceptos de ingeniería en el enriquecimiento protéico y en el ensilaje de la yuca, enfocados a resolver las limitantes de su aprovechamiento. Para este propósito se planearon dos actividades específicas:

a) Enriquecimiento protéico

Planteamiento y comprobación de un modelo matemático para la transferencia y generación de calor en la FSS, tomando en cuenta los siguientes factores:

- * Evidencia experimental basada en fundamentos bioquímicos, microbiológicos y físicos.
- * Dependencia del crecimiento con la temperatura.
- * Descripción matemática del biorreactor de lecho empacado fijo.
- * Comprobación del modelo en base a resultados experimentales.
- * Utilización posterior del modelo en el diseño y control de biorreactores de FSS.

b) Ensilaje

Caracterización del proceso desde un punto de vista de bioingeniería, contemplando la utilización de lactobacilos y tomando en cuenta los siguientes factores:

- * Establecimiento de la metodología para hacer estudios de ensilaje.
- * Nivel de inoculación
- * Modelamiento de la cinética de acidificación
- * Planteamiento de lineamientos generales para el control adecuado del ensilaje.

CAPITULO 3. METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Los métodos experimentales empleados en éste trabajo se apoyan en técnicas ampliamente difundidas en el estudio de las fermentaciones. Algunas de ellas fueron adaptadas especialmente para el estudio de las fermentaciones sólidas en los laboratorios del Departamento de Biotecnología de la UAM-I. Así mismo se desarrollaron y adaptaron diferentes dispositivos experimentales, contando con el apoyo del taller mecánico y de soplado de vidrio de la UAM-I, que hicieron posible la realización técnica de este trabajo.

3.1 Ensilaje

3.1.1 Bacterias lácticas

Los microorganismos que se emplearon en este trabajo ya habían sido estudiados previamente y en este trabajo se contribuye a la difusión de su conocimiento.

Se emplearon tres cepas de bacterias del género *Lactobacillus*, y una cuarta del género *Streptococcus*:

- a) Dos cepas de *Lactobacillus* sp aisladas en un trabajo anterior (Velazquez, 1983) a partir de fermentaciones espontáneas (Col fermentada y Pozol).
- b) Una tercera cepa fue aislada de col fermentada y posteriormente identificada como *Lactobacillus casei* (Velazquez, 1983; Pozo, 1983)
- c) Se utilizó también una cuarta cepa de colección *Streptococcus thermophilus* ATCC 1469.

3.1.2 Agar y medio de Rogosa

Los medios de conservación y propagación empleados tuvieron como base la composición de aquellos diseñados para bacterias lácticas por Rogosa en 1959 (Sharpe, 1981).

Las cepas fueron conservadas en agar Rogosa modificado (ver Apéndice II), al medio líquido se le adicionó 15 g/l de agar bacteriológico. Este medio fue esterilizado a una presión de 1 kg/cm durante 15 minutos, en autoclave de vapor.

El medio de agar se inoculó por azada y se incubó durante 24 horas a 30 °C y se almacenó a 4 °C. El cultivo resultante fue transferido cada tres meses a otro medio con agar.

Para propagar el cultivo de bacterias lácticas se empleó un medio de Rogosa modificado con la composición que se describe en el Apéndice II. Las cepas de microorganismos fueron transferidas por siembra por azada del agar al medio líquido de Rogosa, previamente esterilizado como se indicó anteriormente.

Posteriormente se realizaron trasplantes consecutivos del cultivo en el mismo medio líquido, la incubación se realizó a 30 °C durante 24 horas sin control de pH. El volumen de inóculo empleado en los trasplantes fue de 10% V:V.

La activación de la cepas se suspendió cuando se alcanzó un valor de pH cercano a 3.8, y un crecimiento de 4 a 6 unidades de densidad óptica por ml (UDO/ml) a 540 nm, en aproximadamente 20 horas de incubación, dicha turbidez correspondió a una concentración de biomasa de 1.5 a 2 g/l aproximadamente.

3.1.3 Condiciones iniciales de ensilaje

Previo a la inoculación de los silos se realizaron regularmente tinciones de Gram, como control bacteriológico. El inóculo de los silos consistió en un cultivo de bacterias lácticas activadas con las características que se describen en el punto 3.1.2

Previo a la inoculación, el pH del medio de cultivo de lactobacilos fue ajustado a 6 con hidróxido de amonio, excepto en los casos en que se especifique otro valor inicial de pH.

La adición de bacterias lácticas se hizo a un nivel de 0.1 l de medio por 0.9 kg de material húmedo (10% V:P), excepto en los casos en que se especifique otro nivel de inoculación. La adición del cultivo de bacterias lácticas fue en condiciones no estériles. La mezcla húmeda se empacó a una densidad de 1.1 kg/l.

3.1.4 Ensilaje de yuca fresca

Se empleó yuca fresca para los fines de comparación de tres metodologías de ensilaje, de selección de cepa y de estabilidad de los silos, descritos en los apartados 5.1 y 5.2.

La raíz del tubérculo de yuca fue lavada y picada a un tamaño de partícula de 1 a 2 cm. El contenido de humedad de la yuca fresca fue de 58 % aproximadamente.

Las condiciones iniciales de la fermentación fueron iguales para los cuatro tipos de bacterias empleada (3.1.3).

La adición de ácidos inorgánicos se realizó a un nivel de 0.1 % V:P, con una mezcla 7:1 en volumen de HCl:H₂SO₄ concentrados.

La incorporación de los diferentes aditivos (cultivos lácticos o ácidos), se hizo en forma manual y la mezcla resultante se empacó en recipientes con bolsas de plástico con una capacidad suficiente para 20 kg de materia fresca.

A las diferentes experiencias se les midió, humedad, pH y ac.

láctico por metilación, etanol y ac. acético, ac. propiónico y ac. butírico (Ácidos grasos volátiles, AGV's) por cromatografía gaseosa los ensayos analíticos fueron practicados cada mes, hasta una edad de 5 meses.

3.1.5 Ensilaje de yuca seca.

Se empleó yuca seca para estudiar los siguientes efectos en el ensilaje:

Estudio	Apartado
Tamaño de inóculo	5.3
Composición y factores ambientales	5.4
Temperatura	5.5
Escalamiento	6.2

Los tubérculos de yuca fueron lavados, picados y secados al sol hasta alcanzar 3-10 % de humedad, el material seco se tamizó utilizando diferentes mallas.

De acuerdo a las necesidades de cada ensayo experimental, se trabajó con diferentes tamaños de partícula (dp), como se describe en la Tabla 3.1.

De los ensilajes realizados con yuca seca (Tabla 3.1), las condiciones iniciales de la fermentación (3.1.3) se adaptaron a las condiciones propias del ensayo, como en caso de variación de pH inicial y de tamaño de inóculo.

El inóculo requerido se mezcló con agua suficiente para llevar la humedad del medio a 55 %

Tabla 3.1 Tamaño de partícula de la yuca seca empleado en los diferentes ensayos experimentales

dp (mm)	dp (mm)	No. Malla	Ensayo *
	promedio		
menor 10.00	----	> 5	Ca, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Fibra, Esc
2.38 - 4.00	3.19	8 - 5	dp, Esc
1.68 - 2.38	2.03	10 - 8	dp, Esc
0.59 - 0.80	0.70	30 - 20	dp, pH, T, Io, Esc
0.29 - 0.59	0.44	50 - 30	dp
0.10 - 0.29	0.20	150 - 50	dp

* Io : Tamaño inóculo	Ensayo 5.3
pH y dp	Ensayo 5.4.1
Ca, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Fibra	Ensayo 5.4.2
T : Temperatura	Ensayo 5.5
Esc : Escalamiento	Ensayo 6.2

3.1.6 Microsilos de laboratorio

Para los estudios de diferentes condiciones de ensilado a nivel laboratorio, se emplearon dos dimensiones basicamente:

Capacidad 500 g

Se emplearon unicamente para el estudio del efecto de la adición de calcio, sulfato de amonio y fibra descrito en 5.4.2.

Se usaron frascos de vidrio, de dimensiones 8 DI x 10 cm y capacidad de 500 ml, con tapa roscada y una salida Bunsen, para expulsión de gases como se puede apreciar en la figura 3.1 a.

El tamaño de partícula fue menor a 1 cm, la relación $L/D = 1.25$, y $D/dp = 8$. Los frascos fueron mantenidos a 30 °C en una incubadora de uso microbiológico.

Capacidad 50 g

Para fines de estudio de variación de pH inicial y de tamaño de partícula (5.4.1) y efecto de la temperatura en el ensilaje (5.5), se emplearon tubos de ensaye Pyrex no. 9800 de 22 DI x 140 mm con capacidad de 65 ml.

A los tubos les fueron adaptados tapones de hule con salida para gases tipo Bunsen, como se aprecia en la figura 3.1 b.

Los tubos fueron incubados en un baño de agua, con un recirculador termoregulador Haake E2, teniendo una precisión en el control de temperatura de 0.1 °C, Como se aprecia en la figura 3.1 c.

El tamaño de partícula empleado fue el obtenido entre las mallas 20 y 30, la relación L/D fue de 5 y la relación D/dp de 28 a 37.

3.1.7 Prototipos para medir perfiles de temperatura

A nivel de banco y planta piloto, se trabajaron con 4 tipos de columnas denominadas por su capacidad:

- Columnas de vidrio de 1kg

En cooperación con el taller de soplado de vidrio y taller mecánico de la UAM-I, se diseñaron 2 columnas para medir temperaturas a diferentes posiciones radiales y axiales como se esquematiza en la figura 3.2 y 3.3.

Se emplearon guías dobles de acrílico, para asegurar la posición de los diferentes termopares en la dirección radial. Con este diseño fue posible obtener mediciones de temperatura en 6 posiciones radiales, en puntos dispuestos en espiral a valores adimensionales de radio de 0, 0.4, 0.53, 0.67, 0.80 y 1.0, a una altura de 25 cm (0.7 de la altura total). En este caso no se usó el sistemas de aireación del dispositivo experimental.

En la dirección axial fue posible medir temperaturas a la entrada y a la salida de la columna, además de 3 puntos intermedios a lo largo del eje a valores de 0.17, 0.45, 0.74 de la altura total.

Se emplearon columnas de vidrio con chaqueta para recirculación de agua, la temperatura del baño fue controlada con una precisión de ± 0.1 °C, mediante un termoregulador recirculador Haake E2.

Las dimensiones características de este aparato se detallan en la Tabla 3.3.

- Torres de 15, 40 y 90 kg

En el escalamiento del ensilaje (5.2) se utilizaron las 3 columnas de distintas dimensiones, que se describen en la Tabla 3.3.

Las torres se incubaron en una cámara de temperatura constante de uso microbiológico, a una temperatura de 33.3 ± 3 °C.

Para las 3 torres se realizaron mediciones de temperatura, a valores adimensionales de radio 0, 0.4, 0.8, y 1. A una profundidad de 20 cm de la parte superior.

Para la torre de 40 kg se obtuvieron también mediciones de la temperatura en el centro del cilindro y a diferentes alturas.

En la columna de 90 kg, se hicieron también mediciones a 10 cm de la superficie.

Tabla 3.2 Dimensiones características del escalamiento de silos

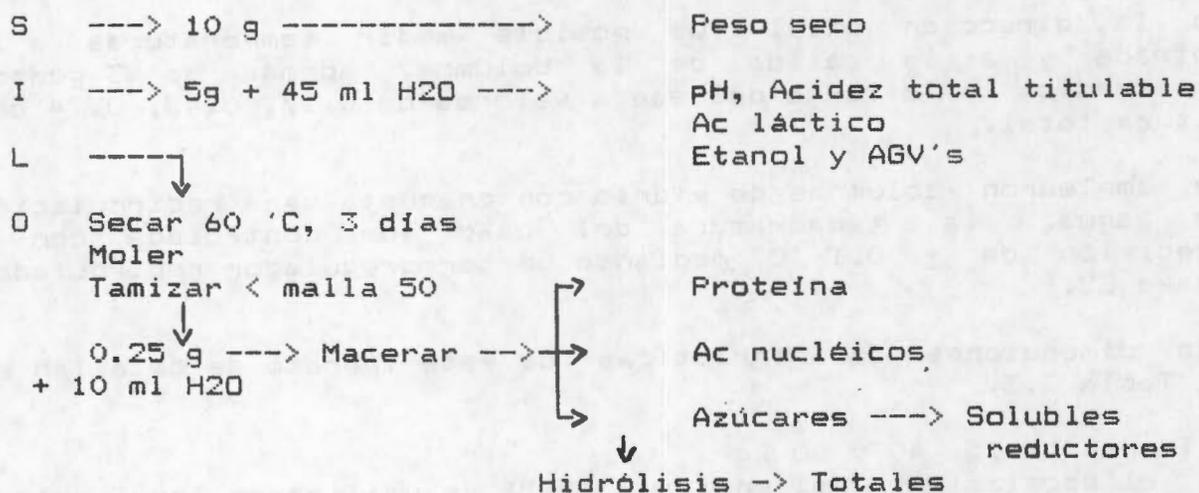
Cap (kg)	L/D	D/dp	D (cm)
1	5.8	75 - 100	6
15	3.0	76 - 107	18
40	3.0	63 - 105	25
90	0.6	> 55	55

3.1.8 Tratamiento de muestras

Se prepararon tantos microsilos como muestras se requirieron.

Se tomaron muestras por duplicado a intervalos regulares de tiempo.

Los análisis de cada muestra se realizaron por duplicado.



3.2 Enriquecimiento proteico

La mayoría de los métodos empleados en los estudios de enriquecimiento proteico de la yuca ya han sido empleados anteriormente y solo serán mencionados brevemente.

3.2.1 Hongos filamentosos

Se empleó *Aspergillus niger* var. *henerbergii* cepa No. 10, (Raimbault, 1980)

3.2.2 Medio de conservación de hongos

El medio de conservación fue el mismo que el empleado por Huerta S. (1984), detallado en el Apéndice II.

3.2.3 Medio de esporulación de hongos

El medio de producción de inóculo fue el mismo que el empleado por S. Huerta (1984) detallado en el Apéndice II.

3.2.4 Medio de crecimiento de hongos

El medio de fermentación es similar al empleado por S. Huerta (1984), sin embargo se empleó harina integral de yuca, adicionada de sales de grado industrial, se gelatinizó en autoclave a 1 kg/cm durante 25 minutos, con una humedad inicial de 38 %.

La adición de sales industriales fue como sigue (kg o l):

Yuca integral	10.00
Fosfato de potasio	0.25
Sulfato de amonio	0.26
Agua	3.80

El pH de la solución de sales se ajustó a 3.5

La yuca adicionada de sales fue secada y molida para su posterior utilización, resultando con un diámetro de partícula promedio de 0.45 cm.

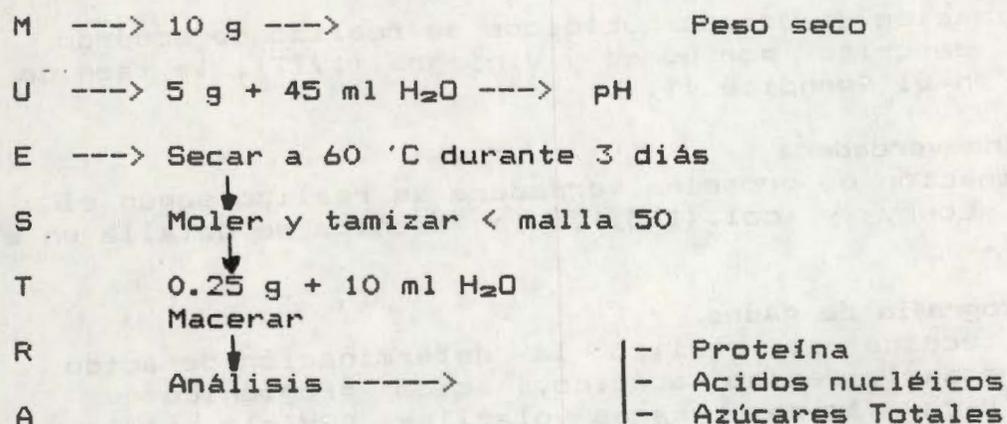
En el momento de la fermentación la humedad del medio fue ajustada a 50 % y el pH a 5 y se inoculó con $2 \times E07$ esporas por g MS, la densidad de empaque fue aproximadamente de 0.75. El nivel de aireación fue de 0.2 l/hr g MS, en los prototipos de 1 lt se trabajó con 450 g MS, es decir con una aireación de 90 l/hr, la velocidad transversal del aire fue de de 3500 cm/hr aproximadamente.

3.2.5 Prototipos para medir perfiles de temperatura, CO_2 y O_2

Se emplearon los mismos prototipos descritos para el ensilaje de 1 kg mencionados en el apartado (3.1.7), pero en este caso se realizó una fermentación con *A. niger* para lograr el enriquecimiento proteico de la yuca, utilizándose el sistema de aireación del dispositivo. Las mediciones de gases se realizaron a la salida de la columna empacada.

3.2.6 Tratamiento de muestras

El tratamiento de muestras es similar al del ensilaje midiendo peso seco, pH, proteína verdadera y azúcares totales.



3.3 Tecnicas analiticas

3.3.1 Tincion de Gram

Para el caso de los lactobacilos se empleó la tinción de Gram como medio de indentificación, se siguió la técnica descrita por Cruiskank et al (1975) que se detalla en el Apéndice II.

3.3.2 Peso seco

La determinación de materia seca se realizó de acuerdo al método descrito por la AOAC (1980), la técnica se detalla en el Apéndice II.

3.3.3 Acidez total titulable (ATT) y pH

La acidez total titulable y pH fueron realizados de acuerdo al método descrito por la AOAC (1980), la técnica se detalla en el Apéndice II.

3.3.4 Acido lactico (Determinacion colorimetrica)

En el ensilaje de la yuca se realizó la determinación colorimétrica de ácido láctico según Barker y Summerson (1941) y Barnett (1951), la técnica se detalla en el Apéndice II.

3.3.5 Azucares reductores libres.

La determinación de azúcares reductores se realizó de acuerdo a la técnica de Miller (1959) que se detalla en el Apéndice II.

3.3.6 Azucares totales

La determinación de azúcares totales se adaptó de la referencias mencionada, haciendo la hidrólisis del almidón bajo condiciones ácidas (Yusaku et al., 1985), pero adaptando el método para la cuantificación de azúcares por el método de Miller (1959), el detalle de la técnica se describe en el Apéndice II.

3.3.7 Acidos nucleicos

La determinación de ácidos nucleicos se realizó de acuerdo al método descrito por Gómez y Viniegra (1977), la técnica se detalla en el Apéndice II.

3.3.8 Proteina verdadera

La determinación de proteína verdadera se realizó según el método de Lowry y col.(1951), la técnica se detalla en el Apéndice II.

3.3.9 Cromatografia de gases.

Con esta técnica se realizó la determinación de ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (ácidos grasos volátiles, AGV's), siguiendo las recomendaciones de Gómez y Coronado (1983), la técnica se detalla en el Apéndice II.

3.3.10 Medicion de temperatura

La temperatura fue medida con termopares tipo J de cobre constantano, marca EIRELEC LTD, modelo Beta, serie BK 1048, el aparato contaba con una precisión de 0.1 °C. En cada ensayo los termopares fueron calibrados individualmente usando termómetros de mercurio con una precisión de 0.1 °C.

3.3.11 Determinacion de CO₂ y O₂

La determinación de gases se realizó para el caso del crecimiento del hongo filamentoso, midiéndose en la corriente de salida de la columna y expresado en por ciento en el aire. Previo al análisis es necesario secar el aire, así primero se pasa por un refrigerante con agua fría (10 °C) y luego por una columna empacada con sílica gel con colorante para humedad.

La cuantificación de CO_2 fue por determinación infrarroja en un analizador Beckman LB2. La cuantificación de O_2 fue por determinación paramagnética en un analizador marca Servomex SIBRON (Oxygen Analyser) modelo 541A.

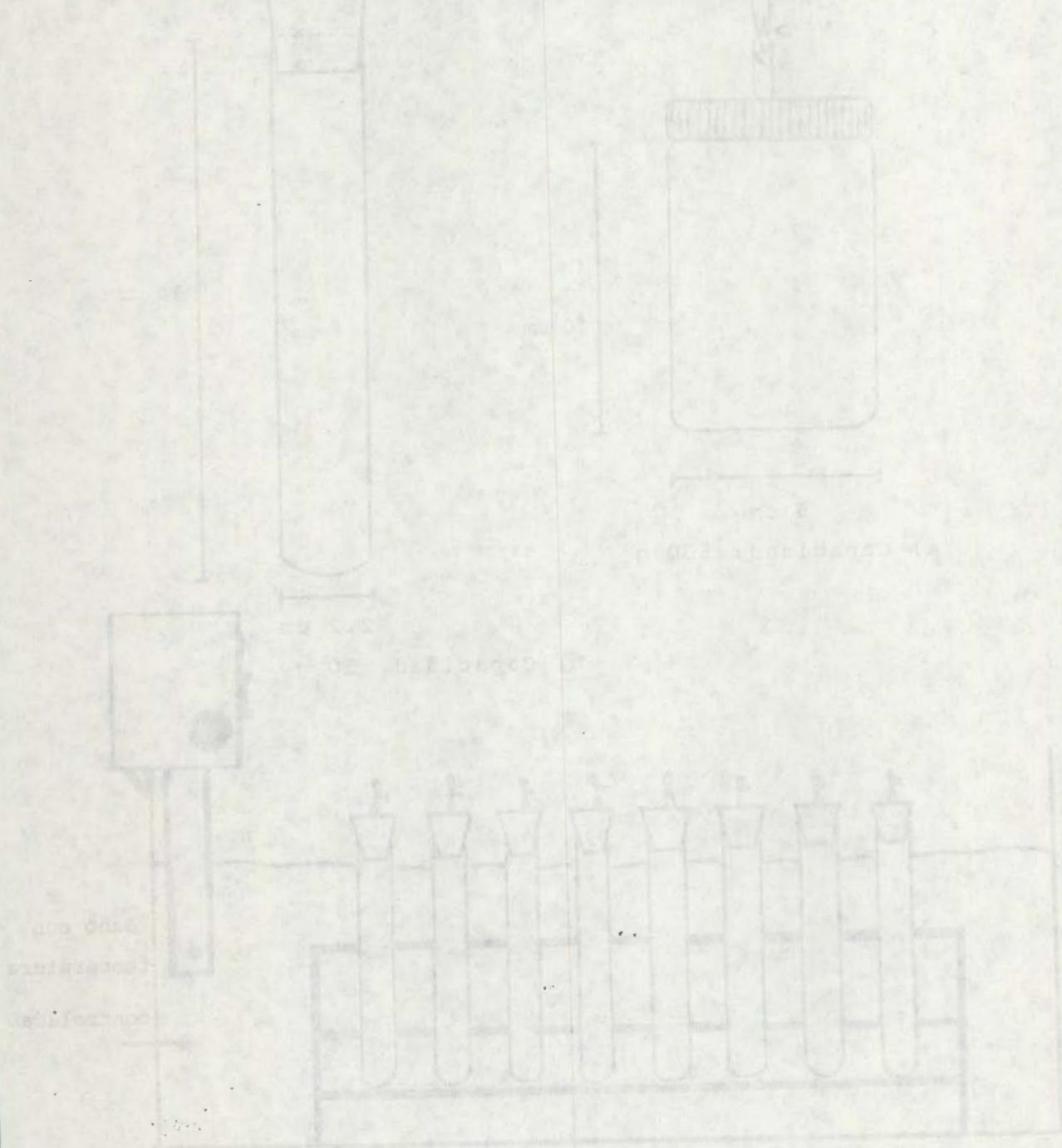


Fig. 1. Diagrama de los dispositivos experimentales para la cuantificación de CO_2 y O_2 en el cultivo de células de *Streptococcus pneumoniae*.

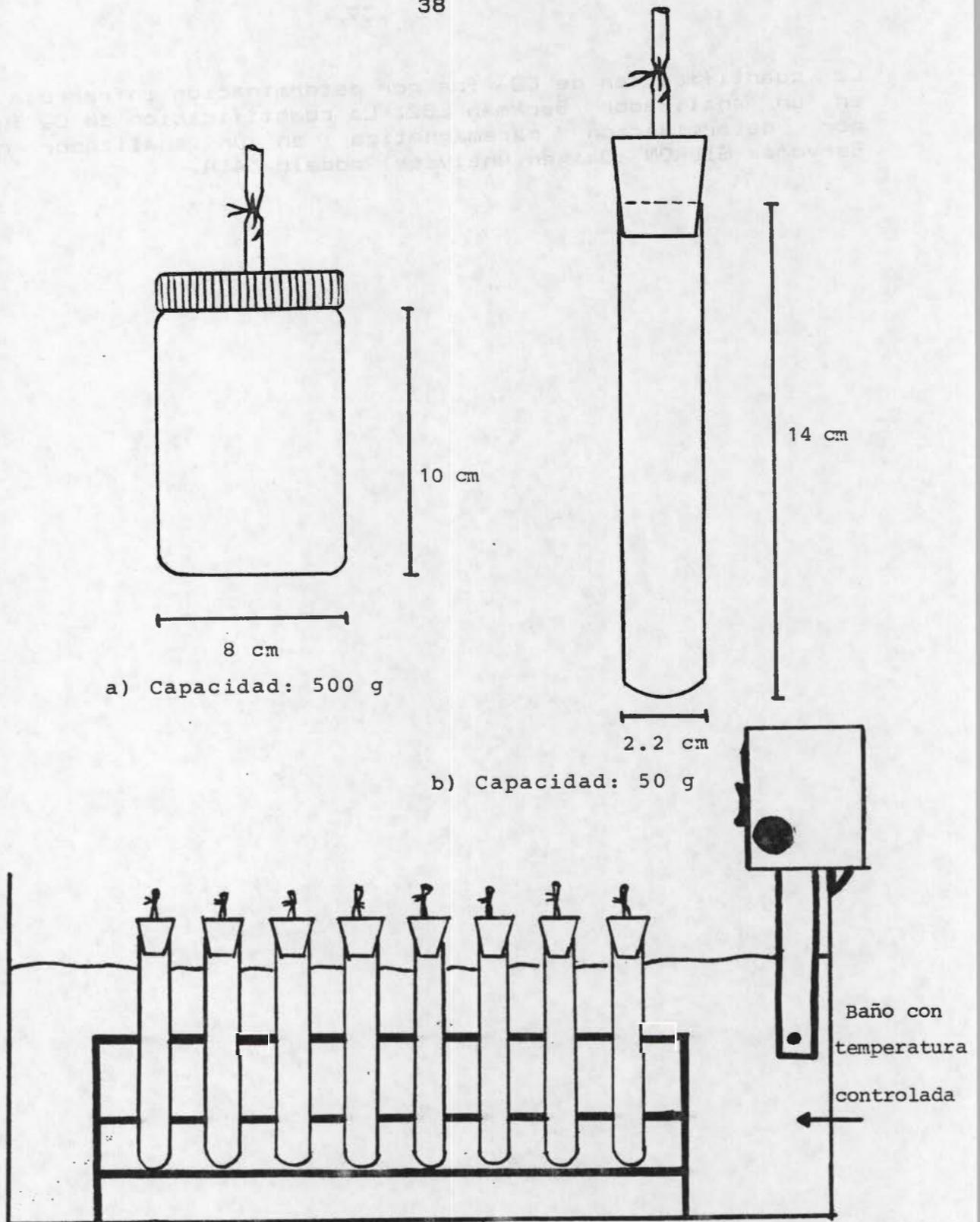
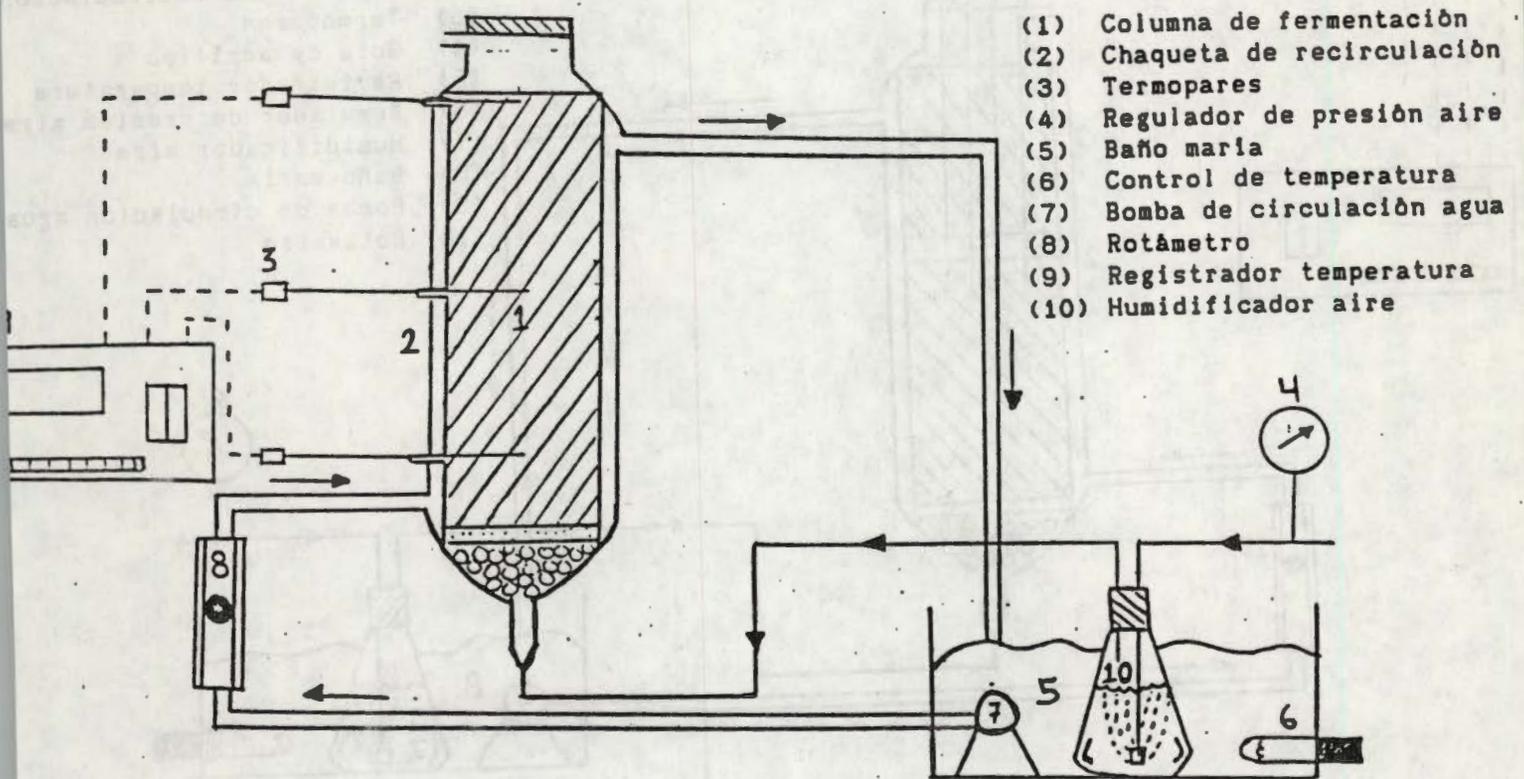


Fig 3.1 Esquema de los dispositivos experimentales de laboratorio empleados en estudios nutricionales (a) y cinéticos (b) del ensilaje de yuca inoculado con bacterias lácticas.



- (1) Columna de fermentación
- (2) Chaqueta de recirculación
- (3) Termopares
- (4) Regulador de presión aire
- (5) Baño maría
- (6) Control de temperatura
- (7) Bomba de circulación agua
- (8) Rotámetro
- (9) Registrador temperatura
- (10) Humidificador aire

Fig. 3.2 Dispositivo experimental para la determinación de perfiles axiales de temperatura en la fermentación sólida de la yuca, con 1 l de capacidad, 6 cm de DI y 35 cm de altura.

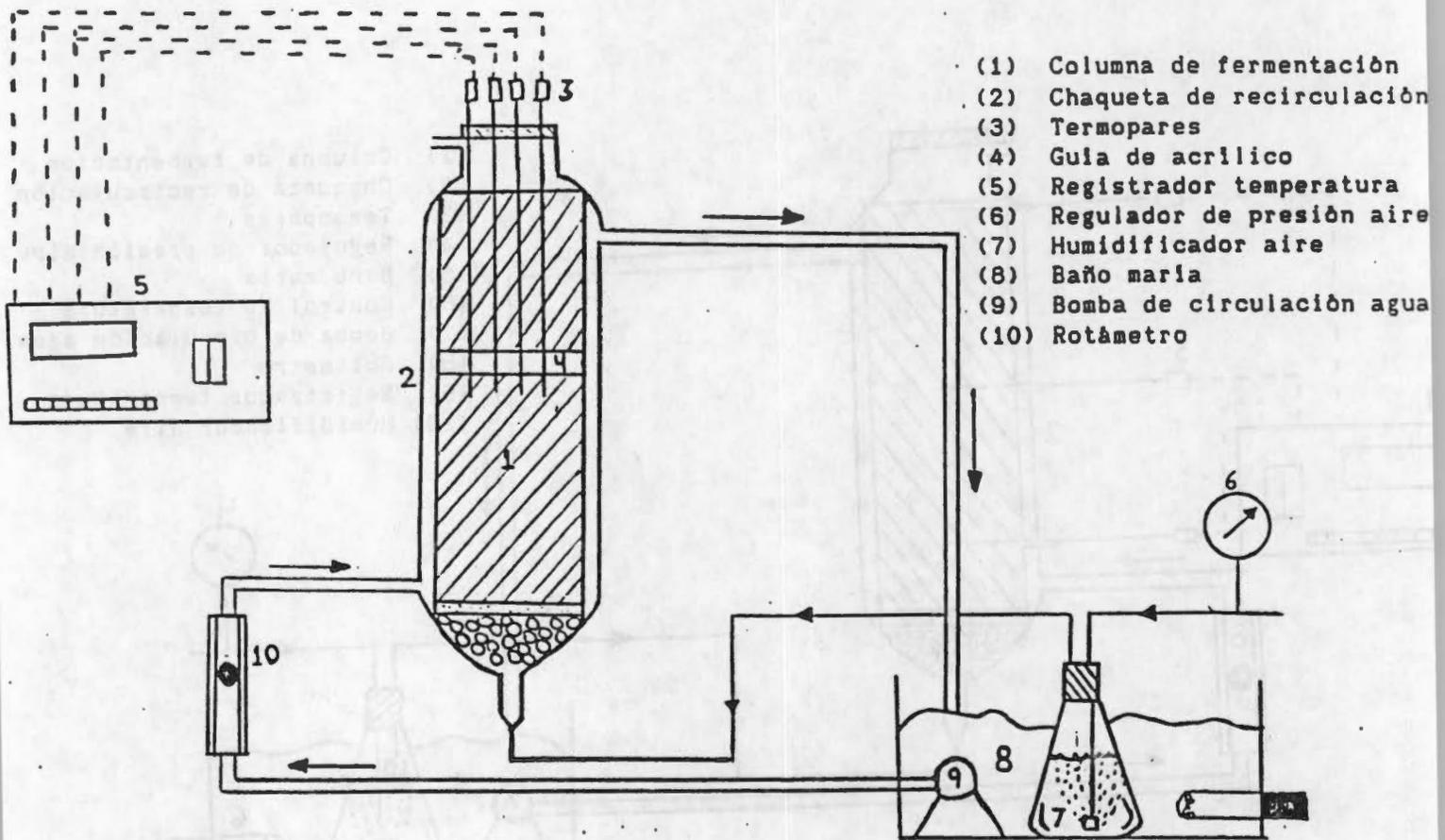


Fig 3.3. Dispositivo experimental para la determinación de perfiles radiales de temperatura en la fermentación sólida de la yuca, con 1 l de capacidad, 6 cm de DI y 35 cm de altura.

CAPITULO 4. SIMULACION DE UN REACTOR DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO

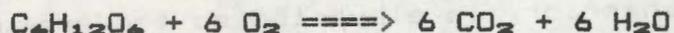
En este capítulo se presenta el desarrollo y validación de un modelo matemático de que describe el comportamiento de un bio-reactor de lecho fijo donde se lleva a cabo el enriquecimiento protéico de la yuca. El problema se estudia desde un punto de vista de reactores químicos catalíticos de lecho empacado, pero con las debidas restricciones propias del sistema biológico.

4.1 Descripción del problema

La utilización de algunos productos agrícolas primarios en la alimentación animal se ha visto limitada por su bajo contenido protéico. Como una alternativa para favorecer la utilización de la yuca en las dietas de animales, se ha planteado aumentar el contenido protéico de dichos materiales. La fermentación en sustrato sólido puede llevar consigo un aumento de proteínas en un factor de 6 a 8, a través del crecimiento de hongos filamentosos (Senez, 1979; Raimbault, 1980).

El crecimiento del hongo, entre otras cosas es posible gracias al consumo de azúcares (sustrato) que se distribuyen en asimilación (formación de biomasa) y en respiración (formación de CO₂).

Durante el crecimiento de los hongos hay un gran desprendimiento de calor debido a la respiración del microorganismo:



Liberando 673 Kcal/g mol de sustrato respirado.

Raimbault (1980), estimó que cerca de 35 % del total de los azúcares consumidos se respira, esto es, que para un incremento de 15 % en proteína MS, se liberan globalmente cerca de 800 Kcal/ kg MS durante la fermentación. Otros estudios indican cantidades mayores de liberación de calor (3 200 Kcal/Kg MS) para sistemas de composteo (Finger et al 1976; Lonsane et al 1985).

Debido a las características del crecimiento, aproximadamente el 80 % del azúcar se consume en 10 horas, por lo que para mantener el medio isotérmico sería necesario remover cerca de 32 Kcal / hr Kg MS, equivalente a enfriar 3.2 l de agua a una tasa de 10 °C hora.

El crecimiento de hongos filamentosos es muy sensible a elevaciones de temperatura, y en el caso de *Aspergillus niger*, 10 a 12 °C arriba de la temperatura óptima (35 - 37 °C) ocurre una disminución notable del crecimiento.

En esta sección se pondrá especial atención en los problemas

de liberación del calor metabólico y la consecuente elevación de la temperatura del medio; estos aspectos se estudiarán mediante modelos matemáticos tanto cinéticos como de transporte de calor (Moo Young et al, 1983).

Finalmente se desarrolla un modelo matemático para la predicción del comportamiento de un reactor de enriquecimiento proteico en medio sólido, basado en fundamentos bioquímicos y fisiológicos, apoyándose en datos experimentales.

4.2 Evidencia experimental

El sistema experimental que se empleó es muy parecido al de Raimbault (1980), por lo que parte de la evidencia experimental se toma de su reporte, y la parte complementaria necesaria para comprobar el modelo se desarrolla en este trabajo. Los dispositivos experimentales que se emplearon se describen en la figura 3.2 y 3.3. La columna de vidrio se empaca con la yuca inoculada y húmeda que se fermenta, a través de la cual se pasaba aire previamente calentado y humidificado. La temperatura del aire de entrada y la del agua que circula por la chaqueta se regularon a 35 °C. En estas condiciones fue posible obtener mediciones de temperatura en la dirección radial y axial de la columna, así como CO₂ y O₂, en el aire de salida de la columna (3.2.5). La metodología empleada en esta sección se describe detalladamente en el capítulo 3.

4.2.1 Cinética de CO₂, O₂ y temperatura

De acuerdo a lo anterior, la elevación de temperatura del medio debería coincidir con la formación de bióxido de carbono y el consumo de oxígeno.

Como una primera etapa para desarrollar el modelo, se midió la temperatura, la formación de CO₂ (%) y consumo de O₂ (%) a la salida del lecho empacado; los resultados obtenidos se describen en la figura 4.1 a y b, aquí se aprecia que existe una clara correspondencia entre las tres variables mencionadas, además de existir fundamentos bioquímicos para ello. De acuerdo a esto, es posible desarrollar un modelo que relacione el crecimiento de la biomasa al consumo de azúcares, la formación de bióxido de carbono y la elevación de temperatura.

Por otra parte la gráfica (Fig. 4.1 b) del coeficiente respiratorio ($CR = CO_2/O_2$) es congruente con otros datos obtenidos anteriormente (Bajrachayra & Mudgett, 1980; Raimbault, 1980), donde se señala que en la región de crecimiento balanceado este coeficiente deberá tener un valor cercano a 1. Desde un punto de vista estequiométrico se puede decir lo siguiente, valores de CR mayores de 1 en la primera etapa de germinación de las esporas, se relaciona posiblemente con un aumento en la asimilación de carbono; mientras que valores menores a 1 en las etapas finales de la fermentación se

relacionan posiblemente con pérdida de carbono de la biomasa, es decir lisis celular.

4.2.2 Perfiles radiales y axiales de temperatura

Con el propósito de obtener los datos necesarios para desarrollar y comprobar un modelo de transferencia de calor se midieron en el reactor los perfiles axiales y radiales de temperatura (3.2.5).

En el centro de la columna mencionada se midieron los perfiles de temperatura en la dirección axial, de las 15 a las 30 horas de fermentación que es la etapa en que se presenta el mayor calentamiento. Los resultados se encuentran graficados en la figura 4.2 a. Las diferencias máximas absolutas de temperatura observadas fueron de 0.04 °C/cm, durante toda la fermentación, esto es 1.36 ± 0.87 °C en toda la longitud del reactor (Fig. 4.2 b), las diferencias máximas observadas en todo el reactor en 72 % de las muestras fueron menores a 1.75 °C (Fig. 4.2 c).

Por otra parte, se midieron los perfiles en la dirección radial, a una altura de la columna de 0.7 de la longitud total, y se encontró que los perfiles de temperatura eran muy importantes (Fig 4.3). Se encontraron diferencias de hasta 5 °C/cm, esto es más de 100 veces respecto al perfil axial, lo que lleva a un calentamiento de 15 °C arriba de la temperatura de incubación en el centro del bio-reactor.

De este manera se concluyó que las diferencias de temperatura en la dirección axial eran menos importantes que los perfiles radiales, y por tanto podrían despreciarse del balance del reactor.

4.3 Planteamiento del modelo teorico

En los apartados siguientes se plantea el desarrollo del modelo tanto para las expresiones cinéticas como para el balance en el bio-reactor.

4.3.1 Modelo cinetico

Dados los argumentos anterior se postuló que el modelo cinético inicial sería el propuesto por Raimbault (1980).

Es decir, modelo logístico para el crecimiento:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = u X (1 - k X) \quad @ t=0 \quad X = 0.0012$$

Consumo de azúcares considerando mantenimiento:

$$R_s = \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_x} \frac{dX}{dt} + m X \quad @ t=0 \quad S = 0$$

Formación de CO_2 como una fracción de los azúcares consumidos:

$$R_c = \frac{d\text{CO}_2}{dt} = Y_{\text{CO}_2} \frac{dS}{dt} \quad @ t=0 \quad \text{CO}_2 = 0$$

donde

- t : Tiempo (Hr)
- X : Biomasa (gX/gMS)
- S : Sustrato glucosa g (S/g MS)
- u : Tasa específica de crecimiento (Hr^{-1})
- K : Inverso del crecimiento máximo (g MS/gX)
- m : Coeficiente de mantenimiento (g S/g X Hr)
- Y_x : Rendimiento de azúcares a biomasa (gX/gS)
- Y_{CO_2} : Rendimiento de azúcares reductores a CO_2 que se respiran (g CO_2 /gS)

4.3.1.1 Dependencia del crecimiento con la temperatura

Raimbault (1980) reportó cinéticas de crecimiento (Proteína) para diferentes temperaturas de incubación (Fig 4.4), datos que son necesarios para establecer la dependencia del crecimiento con la temperatura. Esto se puede hacer a través de la tasa específica de crecimiento (u), así se tomaron los datos de Raimbault (1980) y se estimó u gráficamente, los datos se muestran en la Tabla 4.1

Tabla 4.1 Estimación de u en función de la temperatura para el crecimiento de *A. niger* en yuca

Temperatura (°C)	u (hr^{-1})
30	0.18
35	0.30
40	0.34
45	0.13

Dada la escasez de datos experimentales, las parejas de valores de u y temperatura fueron ajustadas por un polinomio de cuarto orden para interpolar más datos "experimentales" de 30 a 45 °C. Las constantes del polinomio fueron:

$$\begin{aligned} A_0 &= 2.4476847 \\ A_1 &= -0.1690401 \\ A_2 &= 5.6960492 \text{ E-04} \\ A_3 &= 1.6366071 \text{ E-04} \\ A_4 &= -2.6295777 \end{aligned}$$

y un coeficiente de correlación de 0.999

Entre 25 y 45 °C se interoplaron 13 datos y la dependencia de u con la temperatura se ajustó con la expresión propuesta por Esener et al (1981):

$$u = \frac{A \exp(-Ea_1 / RT)}{1 + B \exp(-Ea_2 / RT)}$$

donde

A y B : Constantes
 Ea₁ : Energía de activación
 Ea₂ : Energía de desactivación o desnaturalización
 R : Constante de los gases

Los parámetros fueron estimados por el método de Marquardt (1963) y se encontraron los siguientes valores finales:

$$A = 2.694334 \text{ E}+11 \text{ Hr}^{-1}$$

$$B = 1.300653 \text{ E}+47$$

$$Ea_1 = 70\,225 \text{ J/g mol}$$

$$Ea_2 = 283\,356 \text{ J/g mol}$$

La suma de cuadrados de los residuos fue de 0.0199, y la varianza de los residuos fue de 0.00221.

Los valores encontrados para las energías tanto de activación como de desactivación están dentro del rango esperado para sistemas biológicos enzimáticos (Segel, 1976 y Bailey & Ollis, 1977)

Esta función ofrece la ventaja sobre la tradicional de Arrhenius de describir de una manera completa el incremento de velocidad de crecimiento al aumentar la temperatura, hasta llegar a un máximo, y posteriormente simular la disminución de la velocidad al continuar aumentando la temperatura y presentarse la desnaturalización de enzimas (Fig 4.5).

Otra forma de relacionar el crecimiento con la temperatura es mediante el nivel máximo de crecimiento al final de la fermentación que también es función de la temperatura (Raimbault, 1980). En este caso se tomaron los datos experimentales que se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Crecimiento máximo al final de la fermentación de *A. niger* en yuca en función de la temperatura

Temperatura (°C)	X max (% MS)	Proteína max (% MS)
30	26.7	11.0
35	30.0	12.1
40	28.8	11.6
45	25.4	10.4

Los datos experimentales de biomasa, expresados como fracción en base seca, fueron ajustados por un polinomio de cuarto orden para obtener una función empírica de $1/k$ en el intervalo de interés:

$$1/k = A_0 + A_1 T + A_2 T^2 + A_3 T^3 + A_4 T^4$$

Los valores de las constantes del polinomio fueron:

$$A_0 = - 127.0822$$

$$A_1 = 7.9524$$

$$A_2 = - 0.0159$$

$$A_3 = - 4.0306 \text{ E-}03$$

$$A_4 = 4.7334 \text{ E-}05$$

y un coeficiente de correlación de 0.9999

La dependencia de la biomasa máxima con la temperatura, se trató de ajustar a la ecuación doble de Arrhenius mencionada anteriormente, sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios, y en el modelo se maneja la expresión empírica polinomial.

3.2 Modelo de transporte

El balance de energía en el bio-reactor se hizo usando un modelo dinámico pseudohomogéneo bidimensional, las ecuaciones son (Froment 1972, Hlavacek 1970):

$$\rho C_p \frac{dT'}{dt'} = k \left(\frac{d^2 T'}{dr'^2} + \frac{1}{r'} \frac{dT'}{dr'} \right) - U P C_p \frac{dT'}{dz'} + P (-\Delta H) R_x$$

con condiciones iniciales: @ $t' = 0$ $T' = T_b$

y condiciones de frontera:

$$@ r' = 0 \quad \frac{dT'}{dr'} = 0 \quad \text{y} \quad @ r' = R \quad -k \frac{dT'}{dr'} = h (T' - T_b)$$

$$\text{y} \quad @ z' = 0 \quad T' = T_b$$

donde

Rx	: Definido en 4.3.1
T	: Temperatura (°C)
t	: Tiempo (hr)
r	: Radio del reactor (cm)
Z	: Longitud del reactor (cm)
U	: Velocidad transversal del aire (cm/hr)
(-AH)	: Calor de reacción (cal/g S)
P	: Densidad aparente del empaque (g/cm ³)
Cp	: Capacidad específica (cal/g °C)
k	: Conductividad térmica (cal/cm hr °C)

Las ecuaciones fueron adimensionalizadas de acuerdo a:

$$T = \frac{T'}{T_b} \quad r = \frac{r'}{R} \quad Z = \frac{Z'}{L} \quad t = \frac{t'}{O} \quad O = \frac{L}{U}$$

donde:

L	: Longitud de la columna (cm)
R	: Radio de la columna (cm)
Tb	: Temperatura de incubación (°C)

empleando las siguientes relaciones geométricas:

$$A = \frac{L}{R} \quad m = \frac{R}{dp}$$

y la difusividad térmica (a)

$$a = \frac{k}{P Cp}$$

y los números adimensionales Peclet de calor y Damköhler:

$$Pe = \frac{a}{dp U} \quad Da_{III} = \frac{(-AH) P L Rci}{U P Cp T_b}$$

se llegó a las siguientes expresiones:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{A}{m Pe} \left(\frac{d^2T}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dT}{dr} \right) - \frac{dT}{dZ} + Da_{III} \frac{1}{Rci} Rx$$

donde Rci es la tasa de reacción a tiempo cero.

Debido a que las ecuaciones que describen la reacción en general están expresadas en materia seca, fue necesario introducir la fracción de materia seca (F_{ms}) en el momento real de operación. Por otra parte, de la adimensionalización de las ecuaciones para arreglar el Da_{III}, fue necesario introducir Rci, por lo que ahora es necesario dividir por el mismo término (Rci) para que la ecuación no se afecte.

Se definieron la siguientes relaciones:

$$Ga = \frac{Fms}{Rci} \quad Pe' = \frac{A}{m Pe} \quad Da' = Da_{III} Ga$$

de donde se puede llegar a :

$$\frac{dT}{dt} = Pe' \left(\frac{d^2T}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dT}{dr} \right) - \frac{dT}{dz} + Da' Rc$$

$$\text{donde } Rc = \frac{dCO_2}{dt} = Y_{CO_2} \frac{dS}{dt}$$

$$Rs = \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_x} \frac{dX}{dt} - m X O$$

$$\text{y } Rx = \frac{dX}{dt} = u X (1 - k X) O$$

donde u y k pueden estar definidas como en 4.3.1.1

La adimensionalización de las condiciones de frontera se realizó en forma similar y se llegó a las siguientes expresiones:

$$\text{C.F. @ } r=0 \quad \frac{dT}{dr} = Bi (T-1) \quad \text{y @ } r=1 \quad \frac{dT}{dr} = 0$$

$$\text{C.I. @ } t=0 \quad T=1 \quad \text{y @ } Z=0 \quad T=1$$

donde $Bi = \frac{hR}{k}$ es el número de Biot de calor en la pared

De acuerdo a las consideraciones hechas en la sección 4.2.1, se concluyó que la variación de temperatura en la dirección axial no era tan importante como la radial, por lo que el modelo permite la siguiente simplificación:

$$\frac{dT}{dt} = Pe' \left(\frac{d^2T}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dT}{dr} \right) + Da' Rc$$

con las mismas condiciones de frontera en la dirección radial y la misma condición inicial para el tiempo.

4.4. Comprobación del modelo

Se utilizó el método de colocación ortogonal (Finlayson, 1980; Finlayson 1971 y Finlayson 1974) para discretizar la parte espacial de la ecuación diferencial parcial, resultando un juego de ecuaciones diferenciales ordinarias simultáneas de primer orden, que son integradas por el método de Runge Kutta de 4' y 5' orden (Carnahan, et al 1969).

Así aplicando colocación ortogonal en la dirección radial tenemos:

$$\frac{dT}{dt} \Big|_j = Pe' (B_{j1} T_1 + Da Ga Rx_j), \quad j = 1, \dots, NR$$

$$A_{NR+1,1} T_1 = Bi (T_{R+1} - 1)$$

Donde NR son los puntos interiores de colocación, si NR = 2 se tiene:

$$\frac{dT}{dt} \Big|_1 = Pe' (B_{11} T_1 + B_{12} T_2 + B_{13} T_3) + Da Ga Rx_1$$

$$\frac{dT}{dt} \Big|_2 = Pe' (B_{21} T_1 + B_{22} T_2 + B_{23} T_3) + Da Ga Rx_2$$

$$-(A_{31} T_1 + A_{32} T_2 + A_{33} T_3) = Bi (T_3 - 1)$$

Finalmente a partir de una ecuación diferencial parcial se tienen 2 ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden simultáneas que se integraron por Runge Kutta de 4' y 5' orden junto con las ecuaciones que describen la cinética. Además se tiene una expresión algebraica para calcular el valor de la temperatura en la pared mediante la condición de frontera. Así mismo Colocación Ortogonal permite calcular la temperatura en el centro de la columna.

Se empleó el algoritmo de Marquardt (1963), acoplado a los dos métodos mencionados anteriormente (Colocación ortogonal y Runge Kutta) para realizar la estimación de los parámetros (Pe', Da' y Bi) que caracterizan al bio-reactor.

La validación del modelo se realizó mediante la comparación de 64 valores de temperaturas calculadas y experimentales, en función del radio y del tiempo simultáneamente, $T(t,r)$. Se contó con mediciones de temperatura en cuatro posiciones radiales (0, 0.4, 0.8 y 1 del radio adimensional), a intervalos de una hora de las 15 a las 30 horas de fermentación (Fig 4.3).

De la expresión cinética se aprecia que u y k tienen la posibilidad de permanecer constantes o ser función de la temperatura. Por otro lado, la energía de mantenimiento tiene tres posibilidades, permanecer constante, ser igual a cero o ajustarse nuevamente.

De acuerdo a lo anterior se probaron las combinaciones posibles entre u , k y la energía de mantenimiento (m) analizando variaciones que se indican en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Valores de los parámetros ajustados para las variaciones del modelo durante su comprobación

No.	u	k	m E05	Pe	Da'	Bi	SC	DT
1	Cte	Cte	Cte	1620	5.25	9.09	99.40	1.25
2	Cte	Cte	0.06	3348	3.89	8.96	63.59	0.99
3	Cte	Cte	0	3388	3.86	9.07	63.65	0.99
4	F(T)	Cte	Cte	1468	6.06	8.92	228.52	1.89
5	F(T)	Cte	3.04	1977	6.47	8.14	189.13	1.72
6	F(T)	Cte	0	2251	5.83	8.65	186.92	1.71
7	F(T)	F(T)	Cte	1893	5.45	9.87	236.44	1.92
8	F(T)	F(T)	2.40	2597	5.77	9.24	200.33	1.77
9	F(T)	F(T)	0	2731	5.60	9.62	199.94	1.77
10	Cte	F(T)	Cte	2222	4.44	9.78	141.76	1.49
11	Cte	F(T)	1.84	3637	4.12	9.18	99.46	1.25
12	Cte	F(T)	0	4051	3.86	9.95	97.26	1.23

u = Cte = 0.30

k = Cte = 3.33

m = Cte = 0.07

F(T) : Función de la temperatura de acuerdo a 4.3.1.1

SS : Suma de cuadrados

DT : Promedio de las desviaciones en la predicción

Como criterios de selección en las diferentes variaciones del modelo se tomaron:

- El menor promedio en las desviaciones de la predicción.
- Valores realistas en la estimación de los parámetros.
- Comportamiento razonable en la predicción de la fermentación.

De acuerdo a los criterios anteriores el modelo con el que se obtuvieron mejores resultados fue el que tenía u como una constante, el coeficiente de mantenimiento igual a cero o ajustado en el modelo y k en función de la temperatura (modelos 11 y 12 de la Tabla 4.3).

Posteriormente además del ajuste de Pe' , Da' y Bi se pretendió ajustar simultáneamente la energía de mantenimiento (m) y los valores iniciales de biomasa (X_0) y de temperatura (T_0), con la finalidad de disminuir el error en la predicción. Sin embargo, el valor de T_0 tendió a un valor muy pequeño e irreal (3.5 °C) por lo que esta idea se abandonó, y la temperatura inicial se excluyó del ajuste.

Por otra parte, se contaba con dos corridas experimentales para ajustar los parámetros, esta última versión del modelo se aplicó a los dos juegos de datos, ajustando X_0 , m , Pe , Da' y Bi simultáneamente llegando a los valores en los parámetros indicados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Estimación de los parámetros del modelo final en dos juegos de datos experimentales.

Corrida	m E05	X_0 E04	Pe	Da'	Bi	SC	DT
COND5	2.00	8.74	2976	4.93	10.12	82	1.13
COND19	2.86	4.40	3208	4.26	5.24	82	1.13

Nomenclatura como en la Tabla 4.3

Se puede apreciar que 4 de los 5 parámetros ajustados en las dos corridas experimentales son similares y están en el mismo orden de magnitud, excepto el Biot donde se encontraron diferencias de cerca del 93 %. Pero en ambos casos se observa que la desviación promedio del error en la predicción de las temperaturas es pequeña (1.13 °C), como se puede apreciar en las figuras 4.6 a y b, donde se muestra la comparación de los datos experimentales y calculados por el modelo para los dos juegos de datos.

El contenido promedio final de proteína de estas corridas fue de 14 % aproximadamente.

El modelo definido predice el crecimiento microbiano (Fig 4.7 a y b), el consumo de sustrato (4.8 a y b), observándose que en la zona central de la columna, donde se eleva más la temperatura, el crecimiento y el consumo de sustrato es menor. La diferencia de proteína calculada por el modelo al final de la fermentación entre el centro y la pared fue de 2 %, mientras que la reportada por Raimbault (1980) al incubar a 35 y 45 °C fue de 1.7%. Este modelo permite predecir también la formación de CO_2 como se aprecia en la figura 4.9 (a y b), los valores calculados por la simulación son ligeramente mayores que los encontrados experimentales.

4.5 Discusion del modelo desarrollado

Las condiciones experimentales que se emplearon llevaron a números de Peclet de calor de 4 181 y Biot de 10.0460, con un Re de partícula de 1.61. Los valores de Pe y Bi son muy diferentes a los que se obtienen en reactores químicos catalíticos de lecho empacado ($8 < Pe < 12$ y $0.1 < Bi < 5$), la estimación de estos números indica que en el reactor biológico existe una resistencia a la transferencia de calor mucho más fuerte en el lecho en sí que en la pared y que la

resistencia a la conducción es mucho más alta que a la convección. En resumen se puede pensar que el mecanismo principal de transferencia de calor es conductivo.

Normalmente en reactores químicos los números adimensionales relacionados con transferencia de calor se estiman sin reacción, en este trabajo los números adimensionales fueron calculados con reacción (fermentación) debido a los fuertes cambios reológicos que ocurren dentro del medio a medida que transcurre la fermentación. De tal manera que se estiman números adimensionales promedio durante todo el tiempo de la fermentación, esta es la razón tal vez por lo que la elevación de temperatura en la simulación al principio de la fermentación es lenta.

El material con que se trabajó en la fermentación tenía una humedad cerca al 50% y es una mezcla de sustancias orgánicas siendo en su inicio la mayor parte almidón, para que a medida que transcurre la fermentación la proporción relativa de azúcares disminuya y el contenido protéico aumente, es decir se trata de materiales que en esencia no tienen buenas propiedades térmicas.

Por otra parte, el modelo predice el crecimiento del hongo en diferente forma en el interior de la columna, es decir que en el centro el crecimiento es menor que en la periferia. Esto está de acuerdo a los datos reportados por M. Raimbault (1980) donde el crecimiento a temperaturas mayores de 35 °C es menor en sistemas isotérmicos; las predicciones del modelo en la formación de proteína son congruentes con los datos encontrados experimentalmente.

Además, las otras características de la fermentación como el consumo de sustrato y formación de CO₂, son igualmente diferenciables del centro a la pared, aunque en el caso del CO₂ es importante hacer notar que una vez que se forma el gas se mezcla con el aire que está pasando y se puede estimar el porcentaje en la corriente de salida, lo que de acuerdo al modelo implica realizar un promedio de formación del gas producido en el radio de la columna para cada tiempo.

Por otra parte, este modelo puede ser usado para determinar una estrategia adecuada en el escalamiento de la fermentación sólida, ya sea que el producto final sea proteína unicelular o tal vez productos más valiosos como extractos enzimáticos crudos, metabolitos secundarios estimulantes del crecimiento vegetal (ac. giberélico) o antibióticos (penicilina). Seguramente esta metodología de estudio de bio-reactores, podrá ser aplicable a otros sistemas fermentativos de sustrato sólido que involucren a fibras celulósicas u otros soportes inertes y microorganismos como *A. niger*, *A. terreus*, *T. harzianum*, u otros más.

El escalamiento del proceso se puede llevar a cabo a través del manejo de las condiciones de operación, geometría y dimensiones del reactor, así como las características del material que sirve de soporte y sustrato al crecimiento del hongo, como contenido de humedad, densidad de empaque y tamaño de partícula. Todos estos aspectos de alguna manera están contemplados en los números adimensionales de Peclet, Damköhler y Biot del reactor, que de una manera cuantitativa establecen las relaciones entre los diferentes factores mencionados.

Este modelo puede servir para escalar reactores en otras geometrías, como cartesiana (Zymotis) o posiblemente toroidal (Petrin). Posiblemente haciendo algunas modificaciones al modelo, se podrán simular reactores dinámicos con agitación intermitente (Petrin).

Para la biosíntesis de algún producto valioso está justificado el control del reactor, y el primer paso para hacer dicha tarea es contar con un modelo que simule el comportamiento del mismo. La temperatura y la formación de CO_2 podrían ser las variables de control dada la importancia que tienen en el crecimiento del microorganismo.

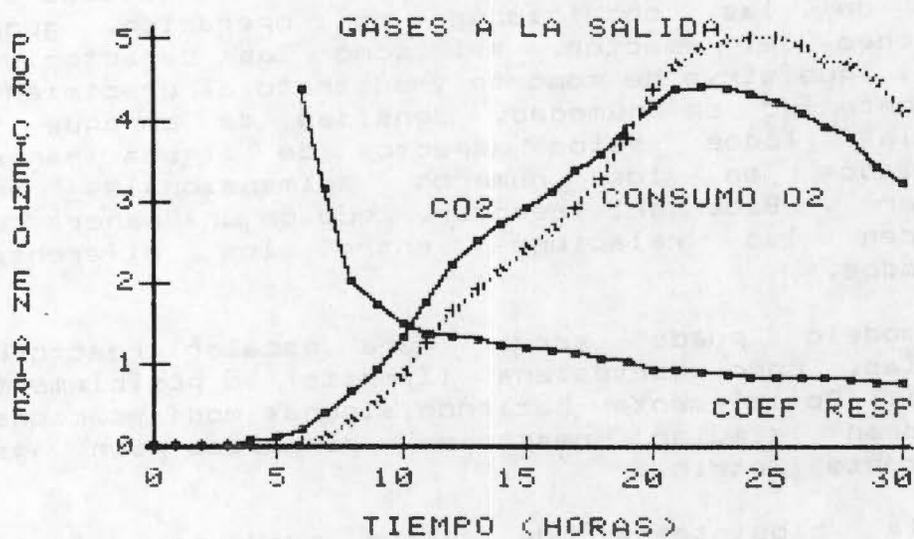
4.6 Conclusion

Se plantea y valida un modelo de transferencia y generación de calor pseudohomogeneo dinámico unidimensional, para la simulación de un reactor de enriquecimiento protéico de yuca mediante el crecimiento de *Aspergillus niger*. Debido a la estimación de los números adimensionales (Pe y Bi) se concluye que el mecanismo de transferencia de calor es esencialmente conductivo.

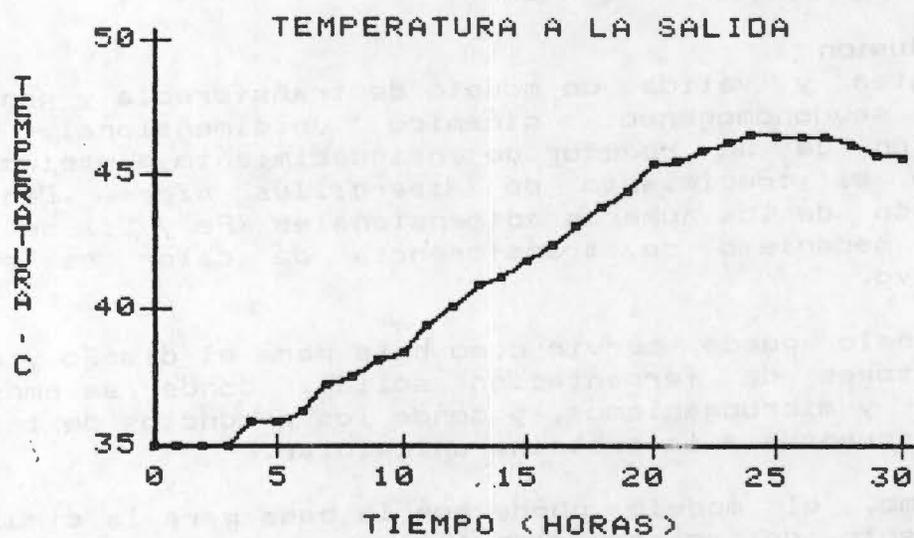
Este modelo puede servir como base para el diseño y escalamiento de reactores de fermentación sólida, donde se empleen otros soportes y microorganismos, y donde los productos de interés sean otros diferentes a la proteína unicelular.

Así mismo, el modelo puede ser la base para la simulación y escalamiento de reactores estáticos en otras geometrías, y posiblemente útil también para reactores dinámicos con agitación intermitente.

Finalmente, este modelo puede ser útil para el control de fermentadores en medio sólido donde los productos recuperables sean valiosos.

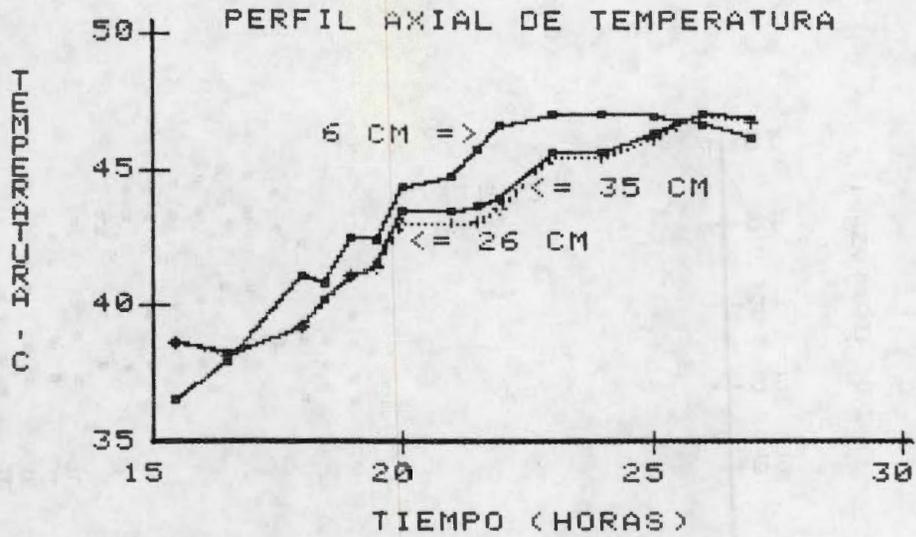


(a)

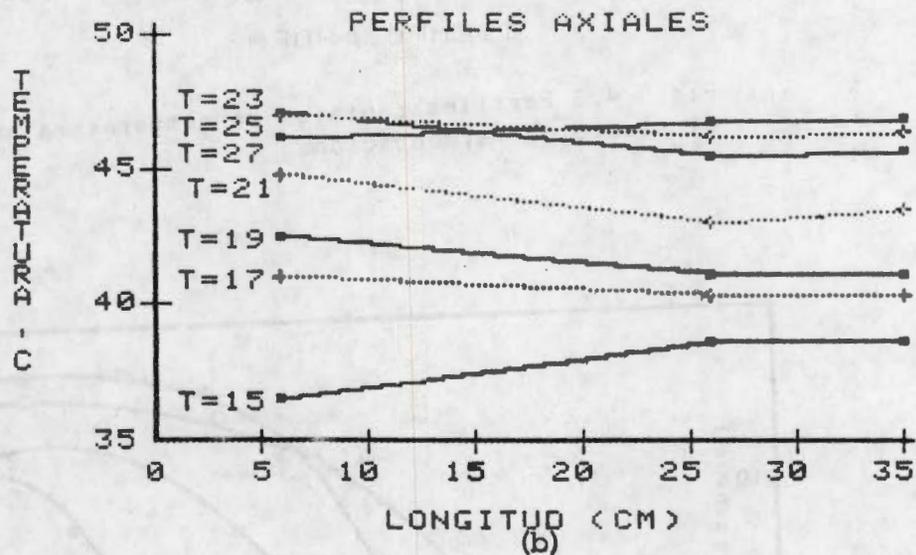


(b)

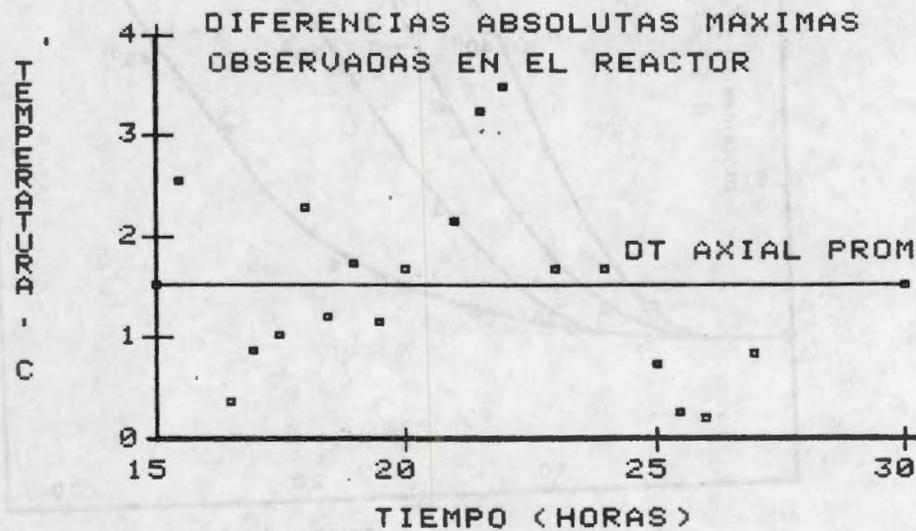
Fig. 4.1 Evolución de CO_2 , O_2 y Coeficiente respiratorio (CR) a la salida del bioreactor de enriquecimiento proteico (a). Aumento de temperatura a la salida de fermentador (b).



(a)



(b)



(c)

Fig. 4.2 Perfiles axiales de temperatura a diferentes alturas del bioreactor (a). Variación axial de temperatura a diferentes tiempos (b). Diferencias

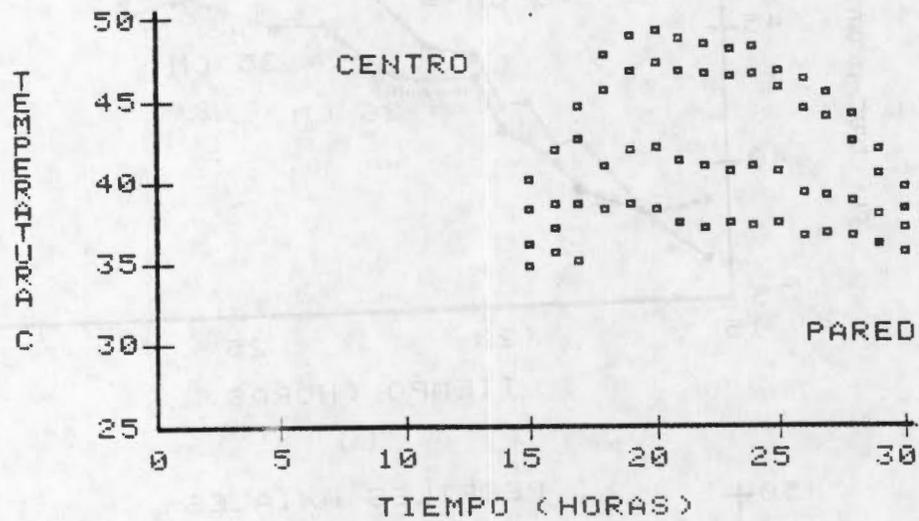


Fig. 4.3 Perfiles radiales de temperatura en el tiempo de fermentación.

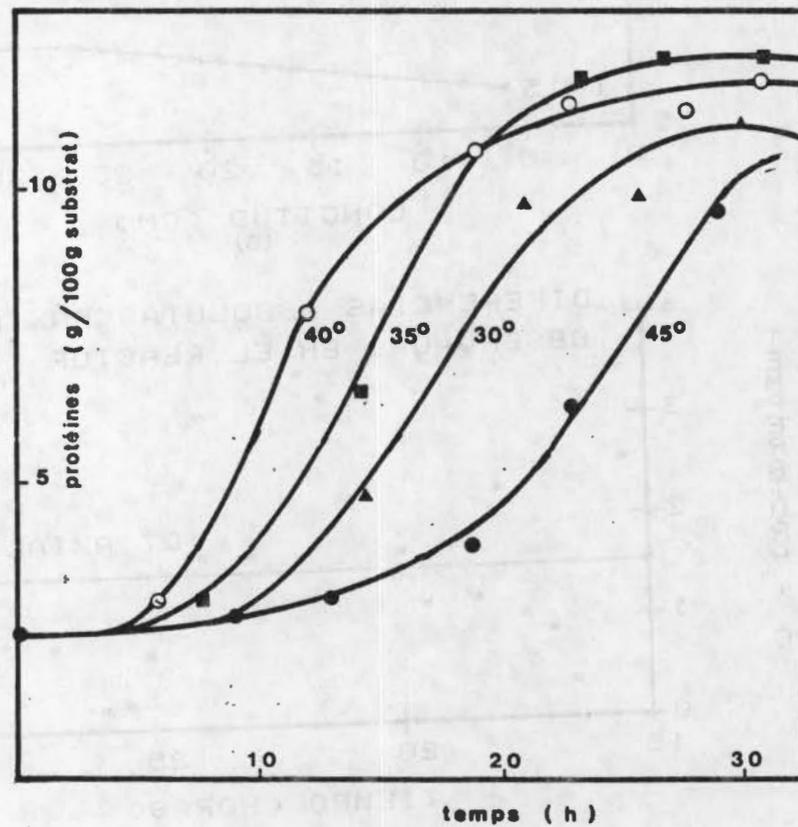


Fig. 4.4 Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento del cultivo sólido (Tomado de M. Raimabult (1980).

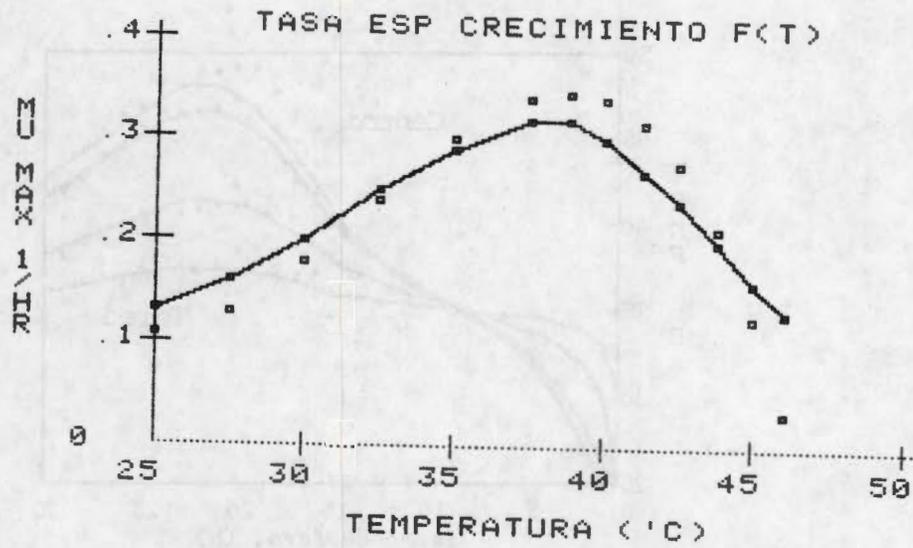
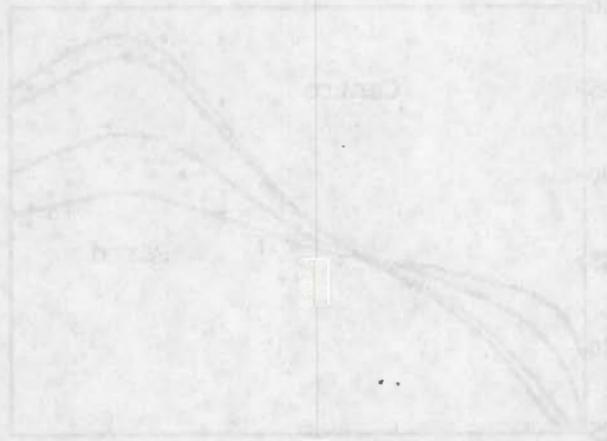
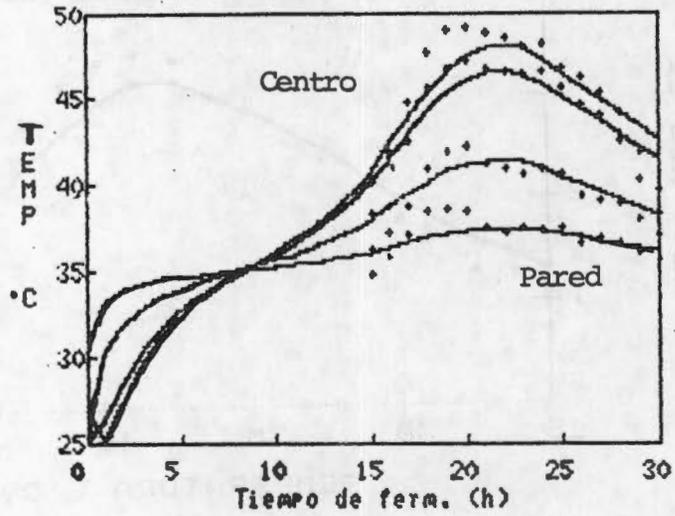
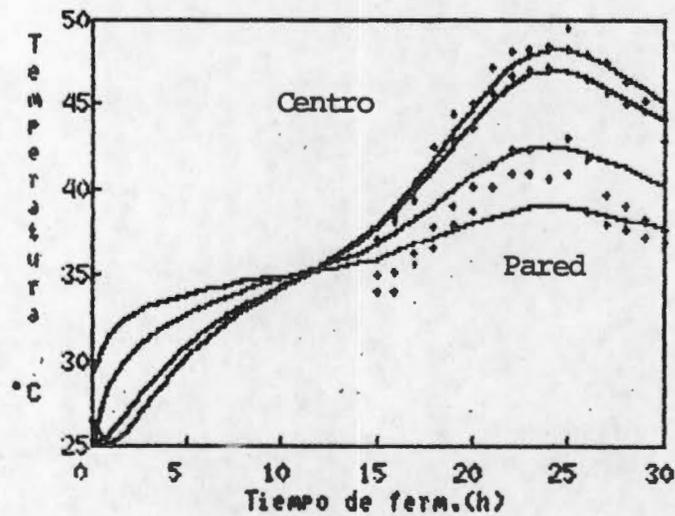


Fig. 4.5 Máxima Tasa de crecimiento (μ) de *Aspergillus niger* en FSS en función de la temperatura. Modelo (----).



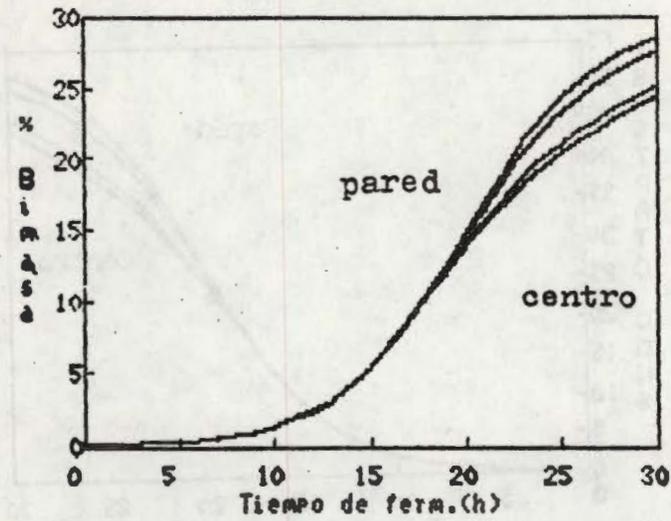


(a)

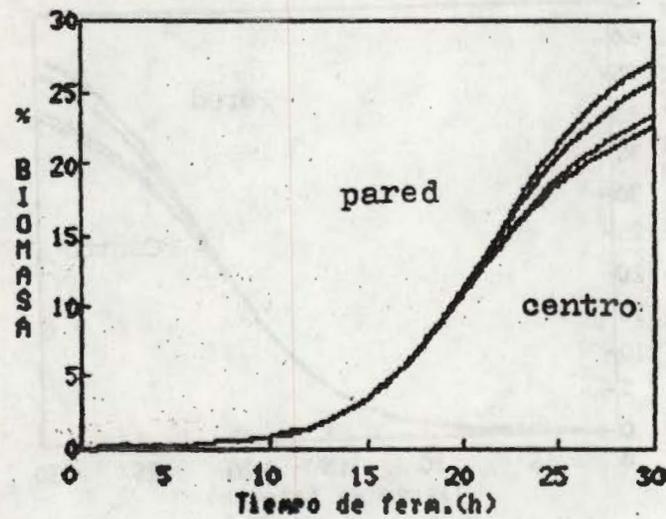


(b)

Fig 4.6 Comparación de temperaturas experimentales y calculadas en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4., (a) COND5 y (b) COND19.

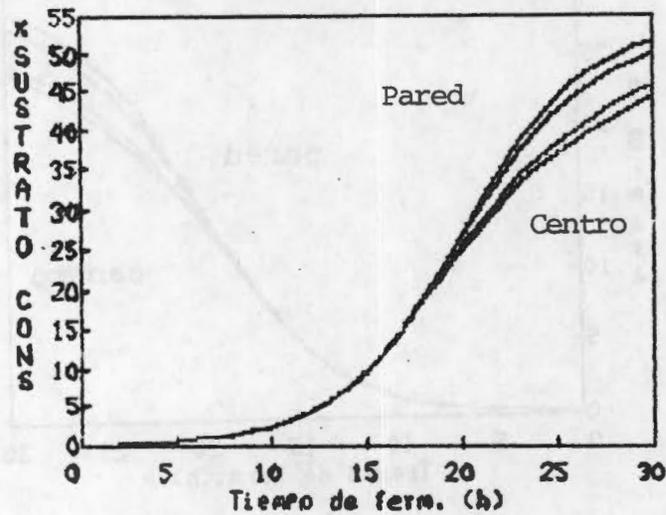


(a)

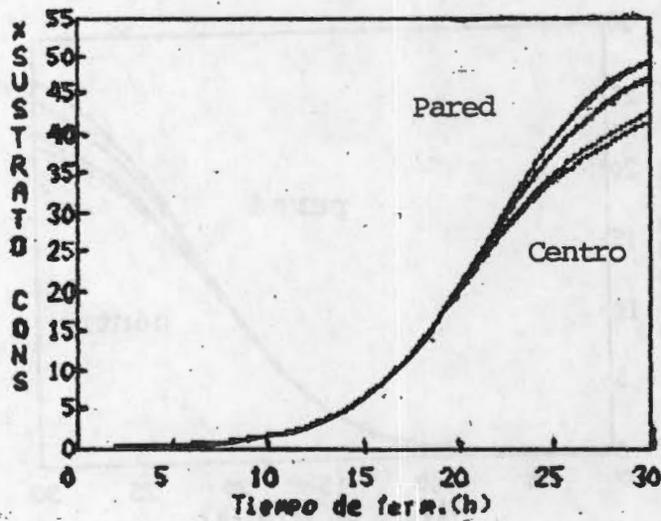


(b)

Fig 4.7 Simulación del crecimiento microbiano en el bioreactor de enriquecimiento proteico en las condiciones de la Tabla 4.4, (a) COND5 y (b) COND19.

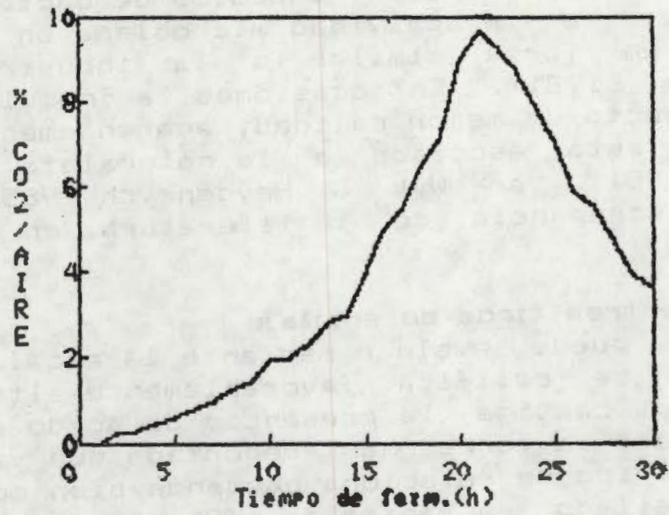


(a)

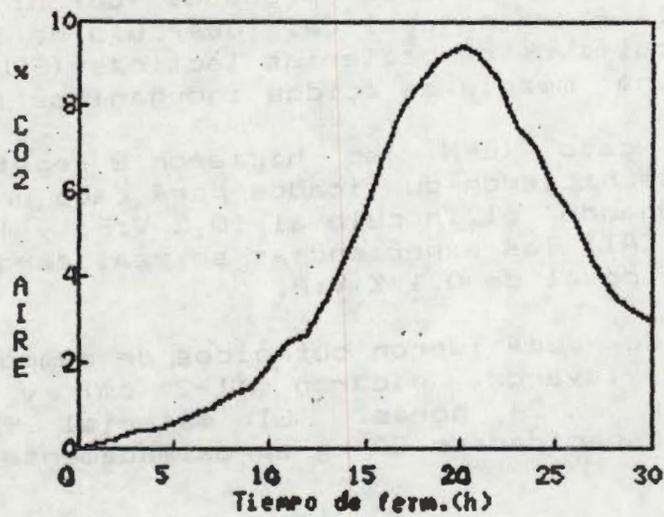


(b)

Fig 4.8 Simulación del consumo de sustrato en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4, (a) COND5 y (b) COND19.



(a)



(b)

Fig 4.9 Simulación de la producción de CO₂ en el bioreactor de enriquecimiento protéico en las condiciones de la Tabla 4.4, (a) COND5 y (b) COND19.

CAPITULO 5. USO DE BACTERIAS LACTICAS EN EL ENSILAJE DE YUCA

Existe discrepancia entre los distintos autores, acerca de la importancia o no de emplear inóculos de bacterias lácticas como iniciadores de la actividad microbiana en la fermentación del ensilaje, en forma similar a la industria de derivados lácteos (Sharpe, 1981). En ocasiones la inoculación ha dado lugar a un producto de mejor calidad, aparentemente el éxito de la inoculación está asociado a la naturaleza de la materia prima (Moon, 1981; Van Wyk & Heydenrych 1985). Es importante probar esta discrepancia de la literatura, en el ensilaje de la yuca.

5.1 Comparacion de tres tipos de ensilaje

El ensilaje se puede evaluar mediante la escala de Flieg de 100 unidades, donde se califica favorablemente altos porcentajes de ácido láctico y castiga la presencia de ácido acético y butírico. Diversos autores han reportado que valores altos de este índice empírico se relaciona bastante bien con la ingesta de material ensilado en animales (Ohyama y Masaki, 1977; U. Nebraska, 1978).

Primeramente se comparó el efecto de la adición de lactobacilos con otras formas conocidas de ensilaje, estas técnicas ha sido empleadas en otras ocasiones para conservar material lignocelulósico, obteniéndose resultados positivos (Roussos, 1985; Ohyama y Masaki, 1977; U. Nebraska, 1978).

Los tres sistemas de conservación probados fueron:

- a) Ensilaje con la flora natural del tubérculo de la yuca (EFN).
- b) Ensilaje con cultivos de bacterias lácticas (EBL).
- c) Ensilaje con una mezcla de ácidos inorgánicos (EAI).

Para el primer caso (EFN) se hicieron 8 repeticiones, para el segundo (EBL) se hicieron duplicados para cada una de las 4 cepas empleadas adicionando el inóculo al 10 % V:P, y finalmente para el tercer caso (EAI) las experiencias se realizaron por triplicado adicionando el ácido al de 0.1 % V:P.

Los tubérculos de yuca fueron obtenidos de campos de Puente de Ixtla, Mor., se lavaron, picaron (1-2 cm) y ensilaron en un periodo no mayor a 24 horas. El material fue empacado en recipientes con capacidad de 20 kg aproximadamente, a una densidad de 1.1 kg/l.

De acuerdo a la adición del inóculo o de la mezcla de ácidos, el porcentaje de humedad cambió, así para los silos con flora natural fue de 57.0 ± 0.7 , para los inoculados de 63.5 ± 0.3 , y para los adicionados con ácido de 57.2 ± 0.7 .

En la Tabla 5.1 se agrupan los valores de pH, para cada tratamiento. En ensilaje sin inocular no cumple con la condiciones

para lograr la conservación de la yuca, que exige valores de pH menores a 4 para evitar la desaminación de aminoácidos, evitando la putrefacción debida a la actividad proteolítica de clostridios (McCullough, 1977).

Tabla 5.1. pH al final del ensilaje *

Tratamiento	Repeticiones	pH promedio
Sin inocular	8	4.11 ± 0.14
Inoculados	8	3.63 ± 0.13
Acido	3	3.16 ± 0.15

* Datos obtenidos de 30 a 140 días

Para fines de estudio de adición de bacterias lácticas, se emplearon tres cepas de *Lactobacillus* y una de *Streptococcus termophilus* de colección. Las cepas de *Lactobacillus* se aislaron en un trabajo previo a partir de fermentaciones espontáneas (Pozo, 1983), en la Tabla 5.2 se presenta su origen, y los productos metabólicos durante el ensilaje.

Tabla 5.2 Análisis de los productos de la fermentación del ensilaje con diferentes tratamientos.*

Tratamientos	Origen	g lactico kg MS	g etanol kg MS	g AGV's kg MS
Flora natural	Tubérculo	19.1 ± 1	5.2 ± 0.2	10.4
<i>L. casei</i>	Col agria	26.5 ± 1	1.7 ± 0.8	0.7
<i>L. sp</i> (1)	Col agria	14.6 ± 1	1.0 ± 0.5	< 0.1
<i>L. sp</i> (2)	Pozol	24.8 ± 3	< 0.1	< 0.1
<i>S. termophilus</i>	ATCC 1469	13.7 ± 2	1.5 ± 0.1	< 1.0
Ad. acido	-----	< 0.1	6.5 ± 1.9	< 2.0

* Datos obtenidos en un lapso de 30 a 140 días

AGV's : Suma de ac. acético, propiónico y butírico

Pozo (1983), concluyó que la formación de ácido láctico en el ensilaje, es poco afectada en el rango de 65 a 55 % de humedad, lo cual elimina la interferencia de los diferentes niveles de humedad, en los casos de fermentación espontánea (EFN) y bacterias lácticas (EBL).

En la Tabla 5.1 y 5.2, se aprecia que los silos inoculados (EBL) presentaron una producción mayor de ácido láctico, respecto a los fermentados de manera espontánea (EFN). El pH de los

silos inoculados alcanzó un valor menor de pH y cercano al pK del ácido láctico (3.84).

Por otra parte, los datos de la fermentación con la flora natural, coinciden con datos de silos comerciales de yuca de 11 ton, de Buenavista, Ver., con un contenido de humedad de 60 %. Se encontraron valores de pH de 4.05 y 22.8 para la acidez total titulable expresado como g de ac. láctico / kg MS, respectivamente

Los silos acidificados artificialmente presentaron una disminución mayor del pH (3.16), sin embargo la cantidad de etanol aumentó (Tabla 5.2). Un contenido elevado de etanol y AGV's disminuye la ingesta libre de este tipo de productos por los animales (Fleig, 1938), por lo que estos productos son indeseables. En la Tabla 5.3 se aprecia que el índice de Flieg fue superior en los silos inoculados con *L. casei*, que en los silos de fermentación espontánea, lo cual permite predecir que el producto inoculado tendría una buena aceptabilidad en el consumo animal (Fleig, 1938).

En el ensilaje es deseable que el producto principal de la fermentación sea ácido láctico, para tener la mayor recuperación de materia y energía, ya que por ejemplo por cada mol de etanol o de ácido acético formado se desprende una mol de CO₂, lo que representa una pérdida de materia y energía (Mc Cullough, 1977).

Debido a lo anterior, se aprecian las bondades de adicionar cultivos de bacterias lácticas como iniciadores de la fermentación del ensilaje de yuca.

Tabla 5.3 Comparación de los metabolitos producidos en el ensilaje con *L. casei*, flora natural y adición de ácido inorgánicos. *

Metabolito (g/kg MS)	Tratamiento		
	Flora natural	Ad acido	<i>L. casei</i>
Ac. láctico	19.5	< 0.1	25.9
Etanol	5.2	6.1	1.4
Ac. acético	9.4	1.2	0.7
Ac. propiónico	1.0	< 0.1	< 0.1
Ac. butírico	< 0.1	< 0.1	< 0.1
% Ac. láctico **	55.6	< 0.1	92.5
Índice Flieg	77.0	< 1.0	100.0

* Datos obtenidos en un lapso de 30 a 140 días.

** : % de ácido láctico en los productos finales de la fermentación

5.2 Selección de cepa y estabilidad del silo.

El criterio de selección de la cepa esta basado en la mayor producción de ácido láctico y en la presencia de un patrón homofermentativo.

De la Tabla 5.2, se puede apreciar que la cepa de *Lactobacillus casei* y la cepa 2 de *Lactobacillus sp.*, formaron alrededor de 2.5 % de ácido láctico BS; así que cualquiera de estas dos cepas podían emplearse.

En un trabajo anterior (Pozo, 1983) se había empleado la cepa de *L. casei*, así que se optó por seleccionarla. De esta forma se tenía la ventaja de comparar resultados posteriormente y brindar información básica sobre la fisiología y comportamiento de la cepa en otro medio, ya que Pozo ensiló yuca enriquecida con hongos filamentosos.

En la Tabla 5.3, se aprecia el análisis de los productos de fermentación para el ensilaje con la cepa seleccionada y los otros dos tratamientos. Es claro que esta cepa, da lugar a un patrón homofermentativo (Doelle, 1975), es decir que más del 90 % de los productos de la fermentación es ácido láctico, en este caso se encontró un valor de 92.5 %.

Se evaluaron las pérdidas en microsilos de 40 kg adicionados de *L. casei* al 10% y mantenidos durante 3 meses a 33 ± 3 °C. Las pérdidas en base seca fueron del 7%, siendo responsables de esto el crecimiento superficial de hongos y la liberación de CO₂ por su respiración. Respecto a la pérdidas en base húmeda fueron del 11%, debido a la evaporación de agua, drenado de líquido y a la contaminación por hongos.

En general las pérdidas postcosecha de productos agrícolas en México, oscilan entre el 30 y 40 %. Se conocen reportes de silos comerciales de yuca (1200 ton), en que las pérdidas son de alrededor del 30 %. El uso de silos adecuados e inoculados con lactobacilos pueden contribuir a la disminución de pérdidas en el ensilaje de yuca (LANFI, 1986).

5.3 Estudio del tamaño de inóculo

En la literatura, no existe un trabajo similar donde se determine el tamaño de inóculo apropiado para ensilaje, así que se recurrió a adaptar los criterios de las fermentaciones lácticas en medio líquido, para seleccionar el tamaño de inóculo, tomándose en cuenta los siguientes criterios:

- a) Velocidad de acidificación
- b) Valores finales de pH y de concentración de ácido láctico
- c) Patrón fermentativo
- d) Consumo de sustrato y rendimientos aparentes
- e) Evaluación del crecimiento

Dado lo anterior, se realizó un estudio detallado para determinar el tamaño de inóculo requerido en el ensilaje de yuca, para este efecto y el resto de los trabajos que aquí se presentan se usó la cepa de *Lactobacillus casei* seleccionada anteriormente.

El tamaño de inóculo se varió en los siguientes niveles: 0, 1, 3, 5 y 10 % V:P. Estas experiencias se realizaron con yuca que fue secada al sol, y con un tamaño de partícula malla 20-30. Como modelo experimental, se emplearon microsilos con capacidad de 50 g (Fig. 3.1), descritos en 3.1.6. La temperatura de incubación se controló a 30 ± 0.1 °C.

En cada experiencia existieron tantos microsilos como muestras eran necesarias, en cada tiempo se tuvieron 2 repeticiones de microsilos, los análisis se realizaron también por duplicado. Se siguieron las cinéticas de pH, acidez total titulable, consumo de azúcares, crecimiento, y al final de la fermentación se analizaron AGV's.

5.3.1 Acidogenesis

En esta sección se analiza el efecto del nivel de inóculo en la formación de productos y la disminución del pH.

Es necesario hacer notar que la determinación de ácido láctico, puede realizarse por cromatografía de gases, por un método colorimétrico y por titulación. Se probaron estos tres métodos encontrando resultados similares, por lo que se optó por la titulación que es una técnica sumamente sencilla.

En la figura 5.1 a y b se aprecian las cinéticas de formación de ácido láctico y pH, a diferentes niveles de inoculación, observándose que las velocidades máximas se presentan al inicio de la fermentación. En el caso de 0% de inoculación, hay un comportamiento errático en las primeras horas de la fermentación, que es corregido por la adición de un inóculo pequeño (1%).

Como se describe en la figura 5.1 b, una inoculación igual o mayor a 1%, llevan al medio a un valor de pH alrededor de 4 al final de la fermentación (Tabla 5.4). Se observa también que la concentración final de ácido láctico se incrementa poco de 1 a 10 % de inóculo. El incremento en la formación de ácido láctico fue hasta de un 75 % al comparar globalmente el promedio de los casos no inoculados y los inoculados.

Por análisis de varianza se rechazó la hipótesis de que el pH y la concentración de ácido láctico finales (48 a 72 horas) no tuviera diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los niveles de inoculación. Se compararon las medias por la

prueba de Tukey (Steel & Torrie, 1980) al nivel de 5%, calculando unos valores críticos de 3.71 para producto y de 0.16 para pH. Siguiendo la representación de Duncan se indican los tratamientos en que se encontraron diferencias significativas entre la concentración de producto (g/kg MS) y pH finales:

	N I V E L D E I N O C U L A C I O N				
	0	1	3	5	10
P	15.86	28.52	29.19	33.05	32.49
pH	4.45	4.00	3.90	3.89	3.83

Tanto para el caso de pH y producto final se encontraron diferencias significativas al comparar 0 % y 10 % con todos los niveles. Entre 1, 3 y 5% no se encontraron diferencias significativas. Dado este análisis recomendamos un tamaño de inóculo alrededor de 1 %, aunque puede ser necesario aumentarlo dependiendo del estado de la materia prima (Moon, 1981; Van Wyk & Heydenrych 1985) y para buscar disminuir ligeramente el pH (Tabla 5.4), ya que un ligero aumento de inóculo podría hacer desaparecer la diferencia significativa entre 1 y 10 %.

En la Tabla 5.4 se aprecia que las velocidades iniciales de formación de producto y la de descenso de pH prácticamente no se modifican a los diferentes niveles de inóculo. Al comparar globalmente los casos no inoculados y los inoculados el incremento en la velocidad de formación de ácido es de 144 %, y de 90 % para el descenso del pH, en las primeras horas de la fermentación. Una velocidad alta de acidificación es una característica importante en el éxito del ensilaje (Mc Cullough, 1977), ya que de esta forma rápidamente se imponen condiciones adversas a microorganismos patógenos.

Al comparar los datos de los microsilos inoculados con *L. casei* (Tablas 5.3 y 5.4) empleado tanto yuca fresca como seca, se aprecia que los valores de acidez total titulable y pH alcanzados son similares. Esto presenta la ventaja de no depender de la estacionalidad del cultivo de la yuca para poder realizar este tipo de ensayos, y emplear yuca seca como materia prima para las experiencias posteriores.

Tabla 5.4 Características cinéticas principales del ensilaje a diferentes niveles de inoculación

Inoculo (% V:P)	pH a	ATT (g lact) a kg MS	Vmax ac b	Vmax pH c	Vmax AS d	Y p/s e
0	4.45	15.9	0.73	- 0.10	- 1.48	0.40
1	4.00	28.5	1.74	- 0.20	- 1.78	0.73
3	3.90	29.2	1.73	- 0.19	- 2.95	0.74
5	3.89	30.1	1.83	- 0.18	- 3.29	0.74
10	3.83	32.5	1.81	- 0.17	---	---

a : Valores final de la fermentación, promedio de 48 a 72 horas.

b : Velocidad máxima inicial de acidificación, en g láctico/kg MS hr, evaluada linealmente de 0 a 9 hrs.

c : Velocidad máxima inicial de disminución de pH, en unidades de pH/ hr, evaluada linealmente de 0 a 9 hrs.

d : Velocidad máxima de consumo de sustrato, en g glucosa/ kg MS hr, evaluada linealmente de 0 a 9 hr.

e : Rendimiento aparente global de formación de ac. láctico y consumo de glucosa (gP/gS).

5.3.2 Patron fermentativo

En la Tabla 5.5 se muestra el análisis de los productos finales del ensilaje a diferentes niveles de inoculación, de 1 a 10 % el producto principal es el ácido láctico, con pequeñas cantidades etanol, ácido acético y butírico, reflejándose en altos valores del índice de Flieg. Para niveles de inóculo mayores o iguales a 1% el patrón fermentativo es homoláctico, probablemente debido a la predominancia de bacterias lácticas activas provenientes del inóculo.

Tabla 5.5 Incremento de metabolitos producidos durante el ensilaje a diferentes niveles de inoculación *

Metabolito g/kg MS	Niveles de inoculación (% V:P)				
	0	1	3	5	10
Etanol	4.5	3.7	2.6	2.9	nr
Ac. acético	5.8	1.0	0.6	1.8	nr
Ac. propiónico	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	nr
Ac. butírico	3.9	0.1	0.1	0.3	nr
Ac. lactico	17.1	28.3	29.2	30.1	32.4 (a)
% Ac. lactico **	54.6	85.5	89.8	85.8	92.5 (a)
Indice de Flieg	42.0	100.0	100.0	100.0	100.0

* : Datos a las 72 horas de fermentación

nr : No realizado

** : % ac láctico en los productos finales de la fermentación

a : Estimado en la Tabla 5.3

5.3.3 Consumo de sustrato limitante

Los requerimientos nutricionales de los lactobacilos son exigentes (Sharpe, 1981), sin embargo el crecimiento celular es escaso en la fermentación láctica. La fuente de carbono puede ser el sustrato limitante para que se lleve a cabo la formación de ácido láctico.

En la figura 5.2, se aprecia la cinética de la concentración de azúcares reductores solubles expresados como glucosa, para diferentes niveles de inoculación. Aquí se aprecia que el nivel de azúcares iniciales aumenta con el tamaño de inóculo. En la literatura se cita que es necesario entre entre 6 - 8 % de azúcares solubles (Mc Cullough, 1977), resultado que es un poco mayor al nuestro, sin embargo se puede explicar debido a la presencia de azúcares solubles no reductores en la yuca (Teles et al 1979; Teles et al, 1980; Battisti et al 1981).

Por otra parte, en la Tabla 5.4 se observa que la velocidad de consumo de sustrato de los casos inoculados es mayor que en los casos sin inóculo. Correspondiendo a la predominancia de bacterias lácticas viables provenientes del inóculo.

5.3.4 Rendimientos

Se analizó el rendimiento de producto formado por sustrato consumido, conocido como $Y_{p/a}$, o rendimiento aparente, en forma similar al rendimiento en reacciones químicas.

En la Tabla 5.4, se observan los valores de rendimientos globales, para los diferentes niveles de inoculación. En la figura 5.3 se presenta la historia de cada uno de estos coeficientes a través de la fermentación. Para los diferentes niveles de inoculación se observa que el valor global que se reporta, es alcanzando asintóticamente partiendo de un valor más bajo.

Los silos no inoculados presenta un valor global de 0.40, menor que en los casos inoculados (0.73), indicando que la inoculación además de aumentar el nivel de acidificación, logra una transformación más eficiente del sustrato, ya que el rendimiento teórico es de 1. Desde un punto de vista estequiométrico los rendimientos bajos pueden significar que la asimilación de carbono es mayor en las primeras horas de la fermentación, lo que es entendible por el crecimiento de la biomasa en este medio pobre.

Para el caso de las fermentaciones lácticas en cultivo sumergido se han reportado rendimientos cercanos a 1, pero empleando un medio de cultivo rico (Luedeking y Piret 1959; Rogers et al 1978).

5.3.5 Evaluación del crecimiento

La biomasa se evaluó por dos métodos:

a) Proteína verdadera por el método de Lowry, 1951

b) Extracción de ácidos nucleicos con ácido perclórico (Gómez y Viniegra, 1977).

Debido al poco crecimiento el método de Lowry, no fue lo suficientemente sensible para detectar los cambios importantes en la biomasa. Este método sirvió para comprobar que la fermentación láctica, no modifica en forma importante el contenido protéico en el medio, lo cual era un resultado esperado. Sin embargo se sabe el crecimiento de bacterias lácticas puede modificar la relación de algunos aminoácidos esenciales, de tal forma que se mejora el valor biológico de la proteína (Sharpe, 1981).

El método de extracción de ácidos nucleicos resultó más sensible, y sirvió como una valoración indirecta del crecimiento, pero finalmente no fue posible cuantificar en forma precisa la biomasa. Los resultados fueron expresados en mg de ARN equivalentes de *Torula* T-VI, de Sigma Chem. Co. A pesar de la deficiencias que pudiera presentar este método, resultó útil en la evaluaciones relativas de la biomasa, en forma similar a otros métodos indirectos que se emplean en microbiología (Wang et al, 1979).

En la figura 5.4, se muestran las cinéticas de incremento de ARN, para los diferentes niveles de inoculación, como una muestra del tipo de datos obtenidos. En la Tabla 5.6 se muestra los incrementos finales y máximos de ácidos nucleicos durante la fermentación, presentando una relación directa con el nivel de inoculación. El nivel inicial de ácidos nucleicos de la yuca fue de 0.49 g ARN/kg MS, y se fue incrementando con las inoculaciones sucesivas, siendo de 0.51, 0.76, 0.86 y 1.15 para los niveles de inoculación de 1, 3, 5, y 10 % respectivamente. Finalmente, los dos métodos probados ampliamente para cultivo sumergido (Wang et al, 1979), no resultaron apropiados para evaluar en forma precisa el crecimiento de las bacterias lácticas en el ensilaje.

Tabla 5.6 Valores finales y máximos de incremento de ácidos nucleicos en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación.

Inoculación (% V:P)	Máximo (g ARN/kg MS)	Final
0	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0.03
1	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01
3	0.48 ± 0.01	0.38 ± 0.01
5	0.52 ± 0.05	0.39 ± 0.02
10	0.63 ± 0.01	0.62 ± 0.02

5.4 Efecto de composición y factores ambientales

Para llevar a cabo cualquier fermentación con éxito es necesario conocer la influencia de la composición del medio de cultivo así como de las condiciones ambientales.

5.4.1 Efecto del pH y tamaño de partícula.

El pH es importante ya que determina aspectos sobresalientes de la actividad biológica (Segel, 1976). El tamaño de partícula no se ha estudiado para el ensilaje y es importante por la relación guarda la anaerobiosis con los espacios vacíos.

Se utilizó yuca seca con un tamaño de 0.6 - 0.8 mm para estudiar valores de pH inicial de 5, 6, 7 y 8. Por otra parte, a un valor de pH inicial de 6 se estudiaron los siguientes tamaños de partícula promedio (mm): 0.20, 0.44, 0.70, 2.03, y 3.19 (Tabla 3.1). En ambos ensayos la densidad de empaque fue de 1.1 g/ml.

Para estos dos estudios se emplearon microsilos de 50 g de capacidad descritos en 3.1.6, e incubados a 30 °C y la inoculación fue de 10 % siguiendo las indicaciones de 3.1.3 y 3.1.5. Las experiencias se realizaron por triplicados.

Mediante la prueba de Tukey no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el pH y concentración de ácido láctico finales para los diferentes de pH iniciales empleados (Tabla 5.7). Indicando que el ensilaje de yuca se puede llevar a cabo en un rango relativamente amplio (5-8), cabe mencionar que el pH de los tubérculos frescos de yuca (6-6.5).

En cultivo sumergido la fermentación láctica presenta una importante dependencia con el pH, sin embargo, es difícil hacer comparaciones ya que en esos casos los medios de cultivo fueron ricos y con control de pH, en contraste de esta fermentación que se lleva a cabo en un medio sumamente pobre y sin control de pH.

Tabla 5.7 Efecto de pH inicial en el ensilaje de yuca a 72 horas de fermentación

pH inicial	Repeticiones	pH final	g láctico/ kg MS
5	3	3.80 ± 0.01	34.96 ± 0.46
6	3	3.80 ± 0.01	35.23 ± 0.50
7	3	3.80 ± 0.01	35.40 ± 0.47
8	3	3.80 ± 0.01	34.08 ± 0.88

Aplicando la prueba de Tukey no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el pH final para los tamaños de partícula estudiados, sin embargo para la formación de producto se encontraron diferencias significativas para los dos tamaños mayores (Tabla 5.8). La cepa empleada no es anaerobia estricta, es posible que al aumentar el tamaño de partícula

aumenten los espacio vacíos y la concentración de oxígeno facilitando la proliferación de microorganismos aerobios compitiendo por el mismo sustrato.

Tabla 5.8 Efecto del tamaño de partícula en el ensilaje de yuca a 72 horas de fermentación

dp (mm) promedio	Repeticiones	pH final	g láctico/ kg MS
0.20	3	3.83 ± 0.02	35.75 ± 0.67
0.44	3	3.84 ± 0.01	36.19 ± 0.47
0.70	3	3.85 ± 0.03	36.07 ± 0.28
2.03	3	3.80 ± 0.01	28.39 ± 0.57
3.19	3	3.80 ± 0.01	26.84 ± 0.04

El pH inicial permite rangos relativamente amplios para que la fermentación se lleve a cabo exitosamente en las condiciones industriales, sin embargo un tamaño de partícula excesivamente grande pueden llegar a ser una limitación.

5.4.2 Efecto de la adición de calcio, nitrógeno y fibra

Los requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas son altos, por lo cual requieren el suministro de ciertos nutrimentos especiales, como pueden ser algunos aminoácidos y vitaminas, así como también algunos cofactores para su sistema enzimático.

Relaciones de C/N bajas son favorables para el desarrollo de la fermentación láctica en cultivo sumergido (Rogers, 1978 et al, Gómez y Coronado-Vega 1983), se puede enriquecer el medio adicionando sulfato de amonio hasta tener una relación carbono/nitrógeno favorable (30) respecto a la original de la yuca (136).

Por otra parte, Rimbault (1980) estudiando el crecimiento de hongos filamentosos en medio sólido, indica que la fermentación esta limitada por el contenido de humedad y propone la adición de bagazo de caña que puede soportar hasta 4 veces su peso de agua.

Además, el calcio es un cofactor importante para la fermentación láctica (Sharpe, 1981), Pozo en 1983 estableció que la adición de hidróxido de calcio es importante para el ensilaje de yuca enriquecida, sin embargo en esa ocasión no se separó el efecto del ión del control de pH por la adición de la base.

Así se estudió el efecto de la adición de cloruro de calcio, sulfato de amonio y bagazo de caña en el ensilaje de yuca. Los

niveles de adición de cada una de las variables se fijó de la siguiente forma (g/kg materia fresca):

CaCl₂ : 0 y 5
 (NH₄)₂SO₄ : 0 y 17
 Bagazo de caña : 35 y 52.5

Se diseñó un experimento factorial completo con 3 variables y 2 niveles, las 8 experiencias se realizaron por triplicado. Se emplearon microsilos de laboratorio con capacidad de 500 g, utilizando yuca seca con un tamaño de partícula menor a 10 mm, las condiciones del ensayo e inoculación están descritas en la sección 3.1.5 y 3.1.6., a excepción del contenido de humedad que fue de 65 %. En los casos de adición de bagazo el tamaño de partícula de la fibra fue similar al de la yuca.

La variación de ácido láctico y pH en el tiempo correspondieron a perfiles típicos de la fermentación y similares a los presentados en las figuras 5.1 a y b.

El análisis de regresión se realizó con las variables independientes codificadas en -1 y +1, la variable de respuesta fue la formación de ácido láctico durante la fermentación. Para cada tiempo los resultados obtenidos fueron expresados en base a materia seca total y yuca seca y analizados mediante una regresión multilíneal de primer orden tomando en cuenta los efectos cruzados de las variables, ajustando el modelo empírico:

$$Y = A_0 + A_1 X_1 + A_2 X_2 + A_3 X_3 + A_4 X_1X_2 + A_5 X_1X_3 + A_6 X_2X_3$$

donde:

X₁ = Cloruro de calcio

X₂ = Sulfato de amonio

X₃ = Bagazo de caña

En las Tablas 5.9 y 5.10 se muestran los resultados de los coeficientes de las regresiones. En el Apéndice IV se muestran los datos completos de pH y formación de ácido láctico para cada uno de los tiempos de la fermentación.

Cuando la formación de ácido láctico fue expresada en términos de materia seca total, se observó que los intervalos de todos los coeficientes cruzaron por cero en los tiempos muestreados, excepto el coeficiente del sulfato de amonio en el segundo tiempo muestreado, indicando la importancia de la fuente nitrogenada en las primeras horas de la fermentación.

En el caso de los resultados expresados en base a yuca seca, se observó que los coeficientes cuyos intervalos no pasaron por cero correspondían a la adición de bagazo de caña. Así mismo aumentaron las correlaciones de las regresiones pasando de 0.55 a 0.70 al final de la fermentación, con los datos

expresados en base a materia seca y yuca seca respectivamente.

La adición de sulfato de amonio y cloruro de calcio, tuvo poco efecto sobre la acidificación, sin embargo el efecto del bagazo de caña, aumentó la formación de ácido. Bajo estas condiciones las necesidades de los lactobacilos en el ensilaje están cubiertas por la propia yuca en lo que respecta a los requerimientos de calcio y nitrógeno (Okigbo, 1980).

Tabla 5.9. Coeficientes codificados de la regresión multilíneal en base a materia seca total

COEF	TIEMPO (Horas)			
	21	44.5	68.5	93
A ₀	11.35	21.23	25.04	26.33
A ₁	-0.07	-1.25	-0.95	-0.85
A ₂	1.21	0.74 *	0.34	0.90
A ₃	-0.04	0.41	1.06	1.88
A ₄	0.53	0.02	0.40	0.07
A ₅	0.50	0.48	0.20	0.23
A ₆	0.49	-0.54	0.08	-1.26
R	0.26	0.67	0.57	0.54

A₀ : Término independiente (Y)

A₁ : Calcio A₄ : Ca-N

A₂ : Nitrogeno A₅ : Ca-Fibra

A₃ : Fibra A₆ : N-Fibra

R : Fracción de la varianza total que es explicada por el modelo

* : Coef. cuyo intervalo de confianza no pasa por cero

Tabla 5.10 Coeficientes codificados de la regresión multilíneal en base a yuca seca inicial

COEF	TIEMPO (Horas)			
	21	44.5	68.5	93
A ₀	13.58	25.87	30.12	31.59
A ₁	-0.12	-1.43	-1.02	-0.87
A ₂	1.32	0.62	0.05	0.77
A ₃	0.33	1.46 *	2.36 *	3.26 *
A ₄	0.02	-1.26	-0.98	-1.51
A ₅	0.30	-0.01	-0.73	-0.32
A ₆	0.67	-0.44	0.36	-1.07
R	0.216	0.75	0.77	0.69

Leyendas como en la Tabla 5.9

Se analizaron las medias de formación de ácido láctico al final de la fermentación agrupando los dos niveles de adición de fibra (Tabla 5.11), con la hipótesis de $U_a > U_b$, con varianzas desconocidas y estimadas por la de la muestra. Se encontró que la producción de ácido se favorece con la adición de fibra, en cualquiera de las bases en que se expresen los resultados. Los valores de pH en todos los casos fue menor a 4.

Tabla 5.11 Análisis de medias de la producción final de ácido láctico en el ensilaje de yuca adicionado con fibra a 10 y 15 % base seca.

Niveles de bagazo	BASE YUCA SECA		BASE MATERIA SECA	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Promedio (g/kg)	34.85	27.90	28.12	24.44
Desv. std (g/kg)	2.89	4.45	3.22	2.88
No. muestras	12	12	12	12
Confiabilidad (%)	95		95	
Incremento (%)	25		15	

El efecto favorecedor de la fibra se puede deber a azúcares residuales del bagazo de caña de azúcar. Es posible también que la fibra actué como reservorio de agua en el ensilaje, propiciando el desarrollo de la bacterias en ese soporte. Sin embargo la adición del bagazo no es una práctica común en la elaboración de silos, y en todo caso su nivel de adición estará sujeta a los requerimientos nutricionales del animal consumidor.

5.4.3 Correlacion de pH y acidez total titulable

Con el propósito de tener un método sencillo para realizar el seguimiento de un ensilaje homoláctico, se desarrolló una correlación empírica entre los valores de pH del medio y la concentración de ácido láctico/kg MS (P) medida como acidez total titulable (ATT). Se tomaron datos de muestras que habían sido preparadas en condiciones ligeramente diferentes, aunque todas ellas inoculadas con *L. casei*.

En la figura 5.5 se muestran los 200 pares de datos usados para relacionar el pH con la ATT en el ensilaje. La tendencia de la curva fue aproximada por una adaptación del modelo mecanístico (Draper y Smith, 1981):

$$- \frac{dpH}{dP} = K (a - pH)$$

donde la velocidad de disminución de pH es proporcional al valor

de pH a una cierta concentración de producto y "a" es el valor límite de pH alcanzado y K es la constante de acidificación. El valor inicial de pH (pH₀) esta dado por:

$$pH_0 = a (1 + b)$$

Los parámetros fueron estimados con el algoritmo de Marquardt (1963) usando la forma integrada del modelo:

$$pH = a (1 + b \exp(-k P))$$

Los valores de los parámetros fueron:

$$a = 3.7362$$

$$b = 0.7477$$

$$K = 0.1019$$

y el coeficiente de correlación fue de 0.9687.

Por otro lado, a través de la ecuación de Henderson Hasselback (Lenhinger, 1972):

$$pH = pK + \log \frac{(\text{Sal})}{(\text{Acido})}$$

se relaciona el pH con la capacidad amortiguadora del complejo conjugado lactato - ácido láctico y con la relación empírica del pH vs ATT, se puede asociar la capacidad amortiguadora del medio con la ATT y el pH (Fig. 5.6 a y b).

Así el nivel de ácido láctico que minimiza los cambios de pH posteriores es de aproximadamente 27.5 g/kg MS. Este un criterio de seguridad en la conservación del material ya que la actividad posterior de microorganismos indeseables se verá disminuida.

En la figura 5.6 b se comprueba que cuando las proporciones del conjugado ácido-base son iguales, el pH del medio se aproxima al valor del pK (3.84) del ácido láctico.

La medición simple del pH puede ser un índice cualitativo de la calidad de la fermentación del ensilaje, pues cuando la fermentación sea típicamente homoláctica el pH tenderá al valor del pK, pero cuando ocurran desviaciones de la vía fermentativa y se formen otros productos, el pH del medio probablemente será mayor ya que por ejemplo el pK de ácido acético es 4.76, del ácido propiónico 4.87 y el del ácido butírico es 5.63 (Lenhinger, 1972).

5.5 Efecto de la temperatura

La dependencia de la acidificación con la temperatura es un aspecto que no ha sido reportado para el ensilaje en la literatura, y que desde un punto de vista de bioingeniería es necesario para el diseño de los silos como bioreactores de fermentación.

El ensilaje se estudió en base a los mismos criterios que en el punto 5.3, es decir:

- a) Velocidad de acidificación
- b) Valores finales de pH y concentración de ácido láctico
- c) Patrón fermentativo
- d) Consumo de sustrato y rendimientos aparentes
- f) Evaluación del crecimiento

Se realizó un estudio del efecto de la temperatura en la cinética de la fermentación del ensilaje de yuca bajo condiciones isotérmicas. Las temperaturas probadas fueron 25, 30, 35, 40 y 45 °C con una variación de 0.1 °C en su control, la inoculación del microsililo fue al 10 % V:P con *Lactobacillus casei*. Estas experiencias se realizaron con yuca seca, con un tamaño de partícula de 20-30 mallas, y que posteriormente fue humedecida al 50 % para el ensayo, se emplearon microsililos de 50 g de capacidad con salida de gases tipo Bunsen. El detalle de la metodología de esta sección se describe en 3.1.5 y 3.1.6.

En cada cinética existieron tantos microsililos como muestras y en cada tiempo se tuvieron 2 repeticiones, los análisis se realizaron por duplicado.

5.5.1 Acidogenesis

En esta sección se analizan los resultados del ensilaje a diferentes niveles de temperatura, en base a la formación de ácido láctico y la disminución del pH.

La determinación de ácido láctico fue por titulación de acuerdo a la razones ahí expuestas en 5.3.

En las Fig 5.7 a y b se observan la cinética de formación de ácido láctico y pH, para las 5 temperaturas ensayadas. Se aprecia que la velocidad inicial de acidificación y de descenso del pH, así como la formación final de producto depende fuertemente de la temperatura (Tabla 5.12).

Comparando la formación final de producto y aplicando la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), entre todas las temperaturas excepto para la comparación de 25 y 35 °C. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) al comparar el pH final de 45 °C con cualquiera de las otras temperaturas ensayadas.

Tabla 5.12 Efecto de la temperatura en las cinéticas de pH y ácido láctico en el ensilaje de yuca inoculado con *L casei*

Temp (°C)	Repet	Vmax ac *	P final **	Vmax pH *	pH final
		g ac lactico kg MS hr	g ac lactico kg MS	pH hr	
25	5	1.23	30.68 ± 0.22	- 0.13	3.89 ± 0.02
30	6	1.83	32.38 ± 0.43	- 0.17	3.84 ± 0.01
35	7	2.47	31.41 ± 0.20	- 0.20	3.74 ± 0.02
40	12	2.06	26.60 ± 0.10	- 0.18	3.79 ± 0.02
45	11	1.31	14.80 ± 0.10	- 0.14	4.29 ± 0.01

* Estimada linealmente en las primeras 9 horas de fermentación

** Promedio de las observaciones al final de la fermentación, de las 48 a 72 horas.

Así la mayor velocidad inicial de la fermentación se registró a 35 °C, mientras que a 30 se encontró la mayor acumulación de ácido láctico.

A temperaturas bajas (25 °C) la fermentación es lenta pero alcanza niveles de acidez aceptables (2.6 % BS) y un pH menor a 4, sin embargo a temperaturas altas (45 °C) la fermentación se ve seriamente afectada ya que el nivel de acidez alcanzado es sumamente bajo (1.5 % BS) y el pH elevado (4.4).

Los resultados anteriores indican que para el caso del ensilaje de yuca inoculado con *Lactobacillus casei* el óptimo de la fermentación oscila entre 30 y 35 °C, siendo una fermentación lenta a una temperatura menor pero viéndose seriamente perjudicada a temperaturas mayores de 40 °C.

Esto indica que en el caso de no tener lactobacilos termotolerantes en el ensilaje y presentarse un calentamiento en la masa, no se alcanzaría la acidez y el pH necesario para conservar la yuca en húmedo por un período prolongado.

5.5.2 Patrón fermentativo

El análisis de los diferentes productos encontrados en el ensilaje incubado a diferentes temperaturas se indica en la Tabla 5.14

A medida que la temperatura se aleja del óptimo de *L casei*, el patrón fermentativo del ensilaje se aleja de un comportamiento homoláctico, como se aprecia en la disminución de Índice de Flieg (Tabla 5.14). El análisis de este fenómeno resulta complicado ya que interviene la dinámica de la microflora que se encuentra presente y que se activa o desactiva de acuerdo a la temperatura. Sin embargo debe tenerse en cuenta

que en el caso de no tener cepas termotolerantes el patrón fermentativo se puede desviar.

Tabla 5.14 Incremento de metabolitos en el ensilaje de yuca a inoculado con *L. casei* en función de la temperatura

Metabolito g/kg MS	T E M P E R A T U R A (°C)				
	25	30	35	40	45
Etanol	0.6	nr	1.3	4.7	< 0.1
Ac acetico	1.2	nr	< 0.1	< 0.1	0.8
Ac propionico	< 0.1	nr	0.3	1.6	< 0.1
Ac butirico	1.9	nr	0.9	1.3	0.3
Ac lactico	30.7	32.4	31.4	26.6	14.8
% Ac lactico	89.0	92.5 *	92.4	77.6	91.9
Indice Flieg	65.0	100.0	80.0	70.0	80.0

* Estimado en la Tabla 5.3

5.5.3 Consumo de sustrato

En la figura 5.8 se aprecia la variación del contenido de azúcares solubles reductores residuales en la fermentación del ensilaje, en todos los casos se observa un descenso del contenido de azúcares fermentables inicialmente (4 % BS) presentes en la yuca. La velocidad inicial de consumo de azúcares es función de la temperatura en todo el rango estudiado.

Para los casos de 30 a 40 °C y alrededor de las 25 horas de fermentación se observa un aumento en el contenido de azúcares reductores, empezando esta actividad cuando el contenido de azúcares es de 2 - 2.5 % BS. Este efecto puede deberse a:

- Que el material contara inicialmente con cadenas cortas de azúcares con terminal reductor
- Presencia de azúcares solubles no reductores (Teles et al 1979; Teles et al 1980; Battisti et al 1981).
- Actividad amilásica en el ensilaje liberando glucosa o cadenas cortas de azúcares con terminal reductor
- Hidrólisis del almidón en medio ácido y temperaturas elevadas

Sin embargo es necesario mayor trabajo básico para determinar exactamente la causa de este fenómeno.

En general en la cinéticas de 30 a 40, y después de 30 horas, se aprecia que a medida que el almidón se hidroliza que empieza a acumularse, por lo que puede inferirse que este no es paso limitante de la fermentación, sino la transformación de la glucosa a ácido láctico.

A pesar de la dificultad para esclarecer el fenómeno observado,

la producción de ácido láctico y el nivel de pH fue adecuado a temperaturas menores a 40 °C.

5.5.4 Evaluación del crecimiento

La evaluación del crecimiento en esta etapa presentó las mismas deficiencias que se han explicado para el caso del estudio de nivel de inoculación (5.3.5), y en la Tabla 5.15, se observan los incrementos en los valores finales y máximos de ácidos nucleicos durante la fermentación. El valor inicial fue de 1.15 g/kg MS, correspondiente al 10 % de inoculación.

Tabla 5.15 Valores finales y máximos de incremento de ácidos nucleicos en el ensilaje de yuca a inoculado con *L. casei* e incubado a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Máximo (g ARN/kg MS)	Final
25	0.31 ± 0.03	0.09 ± 0.03
30	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01
35	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.01
40	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.02
45	0.01 ± 0.01	- 0.19 ± 0.02

De esta Tabla se aprecia que el método de análisis de la biomasa no fue el adecuado pues no permite establecer un patrón claro de crecimiento respecto a la temperatura. Sin embargo para temperaturas menores a 40 °C se observó crecimiento y luego una fase de decaimiento a diferencia de 45 °C donde no se observaron incrementos, sino que continuamente el contenido de ARN disminuyó durante toda la fermentación.

5.6 Conclusion

El efecto principal de la adición de lactobacilos al ensilaje de yuca, es un cambio del patrón heterofermentativo observado en la fermentación espontánea, hacia un patrón homofermentativo, lo que implica pocas pérdidas de materia y energía por la formación de productos ligados a la putrefacción. SE determinó que un inóculo de 1 % era suficiente para llevar a cabo el ensilaje, aunque se considera adecuado aumentarlo ligeramente (1-2%).

La adición de cultivos de bacterias lácticas al ensilaje aumenta la cantidad de ácido láctico formado hasta en un 75 %, y aumenta la velocidad de acidificación hasta en un factor de 1.8 comparado con los silos fermentados con la flora natural. De la misma forma los valores de pH alcanzados son menores a 4, en los silos inoculados, asegurando la conservación del material amiláceo.

La acidificación se realiza en forma mas eficiente en silos inoculados, en términos del consumo de sustrato, los rendimientos globales aparentes Y p/s observados fueron de 0.73, significando un incremento de 80 % respecto a los no inoculados.

En términos de los criterios bioquímicos estudiados en la fermentación del ensilaje, es poca la diferencia entre utilizar yuca fresca o yuca seca como materia prima de las experiencias, lo cual facilita método de estudio de este sistema.

Si existe interés en evaluar el crecimiento bacteriano en el ensilaje deben buscarse métodos más sensibles para la evaluación de la biomasa de bacterias lácticas.

Aunque el pH es un factor sumamente importante para la fermentación láctica se encontró que en un rango bastante amplio (5 a 8) de pH inicial se puede llevar a cabo el ensilaje con éxito.

El efecto del tamaño de partícula sobre la acidificación fue evidente en los tamaños mayores afectando adversamente a la fermentación.

Los requerimientos de calcio y nitrógeno de la fermentación láctica en el ensilaje de yuca están cubiertos por la materia prima. La fibra tiene un efecto favorable en la fermentación aumentando la concentración de ácido láctico un 25 por ciento con la adición de 10 a 15 por ciento de bagazo de caña en base seca. Posiblemente el efecto este basado en la capacidad de absorción de agua y los azúcares residuales del bagazo. Sin embargo esta es una práctica poco común en los silos industriales.

La temperatura tiene un efecto muy importante en las velocidades de la fermentación del ensilaje, así como en la acumulación final de ácido láctico. A este respecto las condiciones óptimas en un silo inoculado con *L. casei* oscila entre 30 y 35 °C, también se observo que el patrón fermentativo se desvía del homoláctico a medida que la temperatura se aleja del óptimo. Haciendo notar que temperaturas menores afectan el patrón fermentativo, pero muy poco los niveles finales de ácido láctico y pH, mientras que elevaciones de la temperatura afectan severamente tanto el patrón fermentativo como el nivel de acidificación y pH finales. En este sentido tal vez es recomendable el uso de bacterias termotolerantes.

El diseño adecuado de los silos y la conservación de la yuca por ensilaje, usando bacterias lácticas, presenta datos experimentales prometedores, que merecen ser evaluados a escala comercial, como una alternativa importante en la disminución de pérdidas postcosecha en este producto.

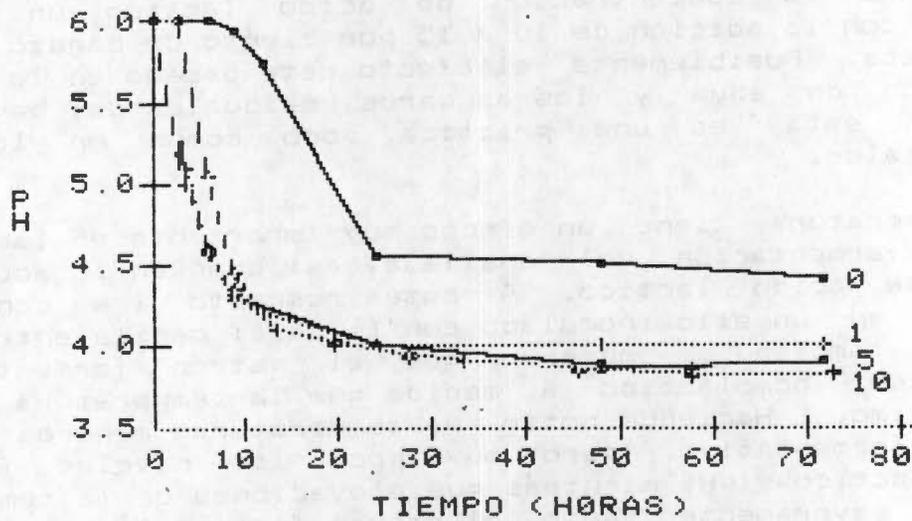
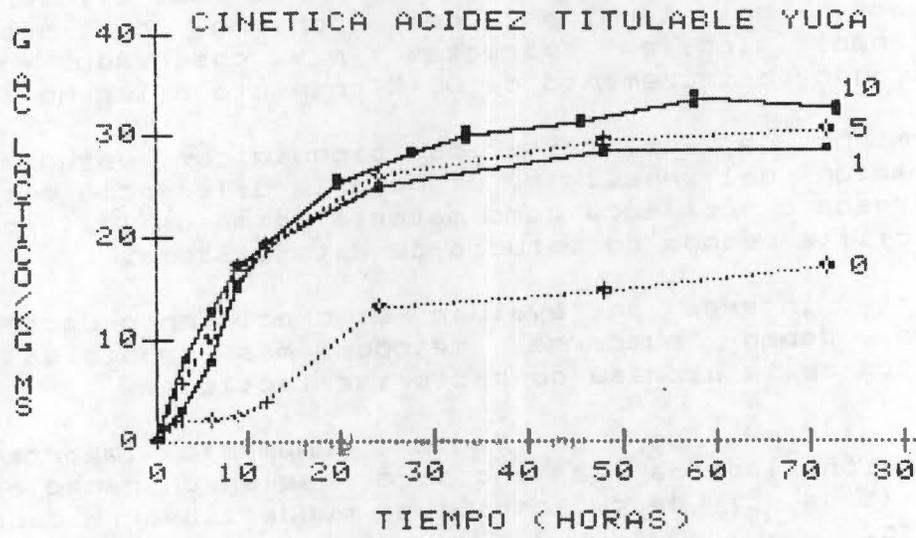


Fig. 5.1 Cinética de acidez total titulable (a) y pH (b) en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con *Lactobacillus casei*.

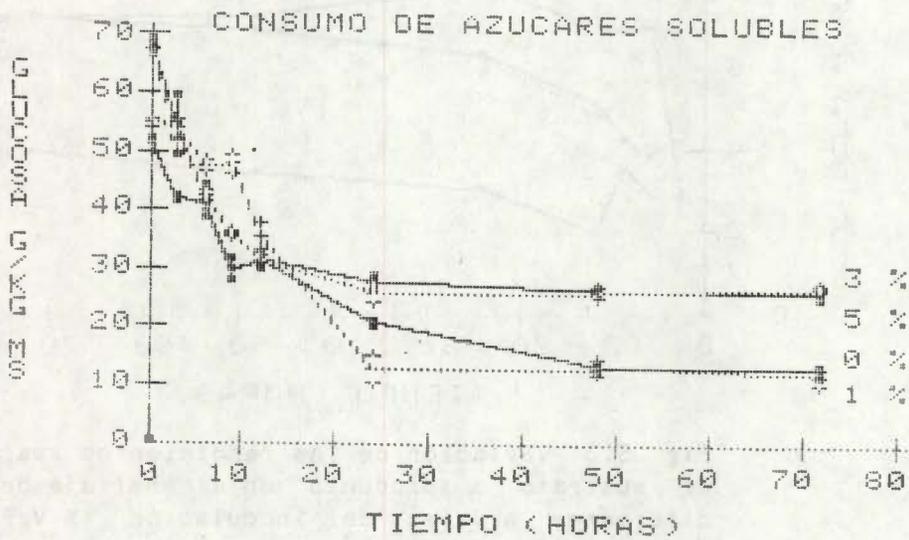


Fig. 5.2 Cinética de azúcares reductores residuales en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con *Lactobacillus casei*.

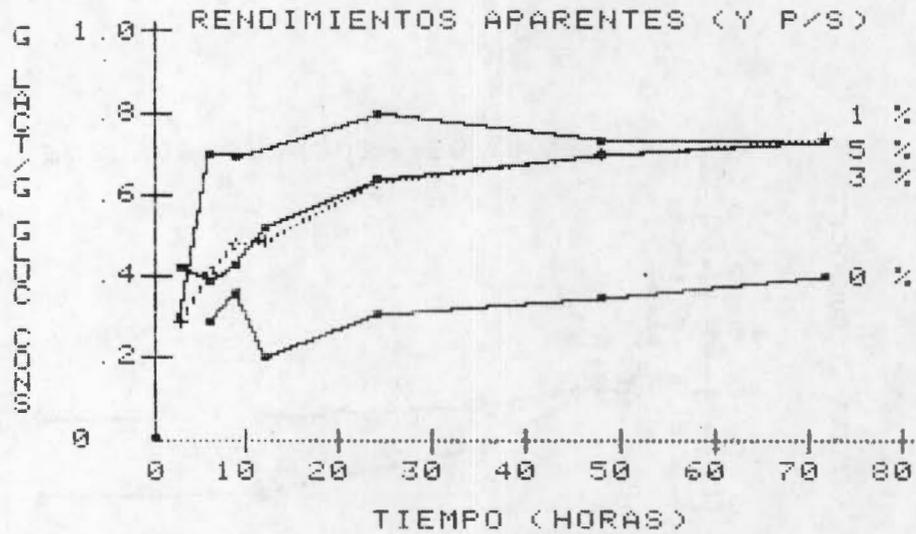


Fig 5.3 Variación de los rendimientos aparentes de sustrato a producto en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con *Lactobacillus casei*.

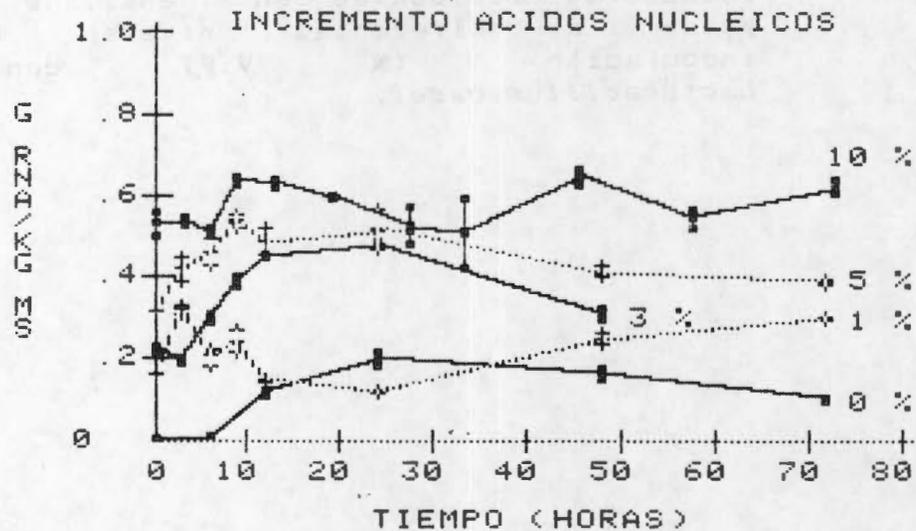


Fig 5.4 Variación del crecimiento expresado en ácidos nucleicos en el ensilaje de yuca a diferentes niveles de inoculación (% V:P) con *Lactobacillus casei*.

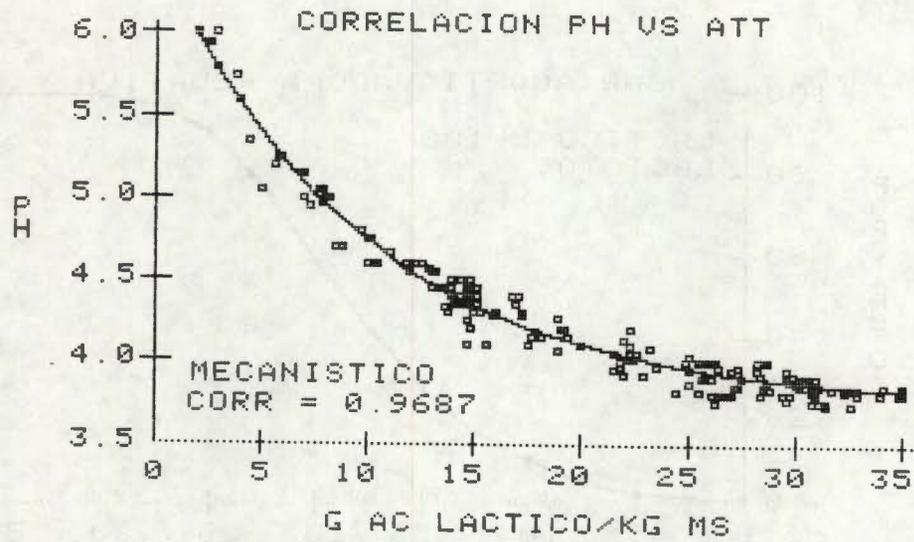


Fig 5.5 Correlación del pH y la Acidez Total Titulable para el ensilaje de yuca adicionado de *Lactobacillus casei*

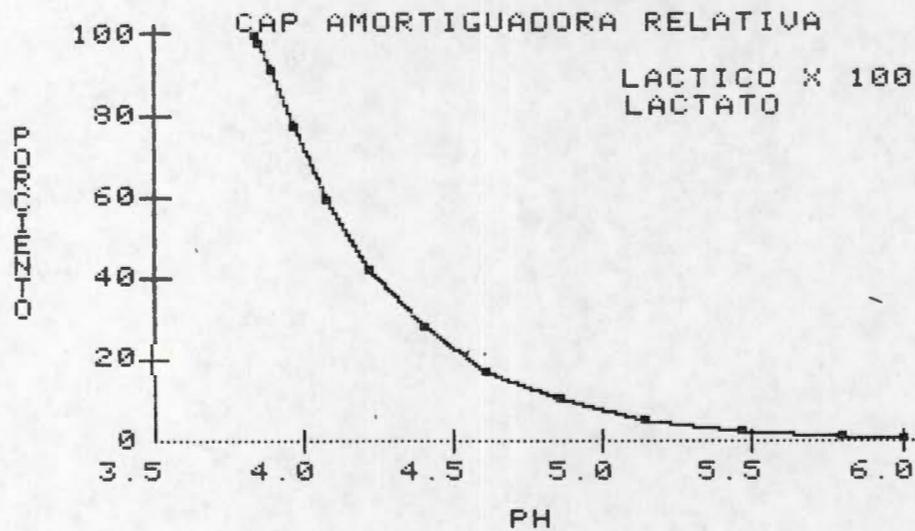
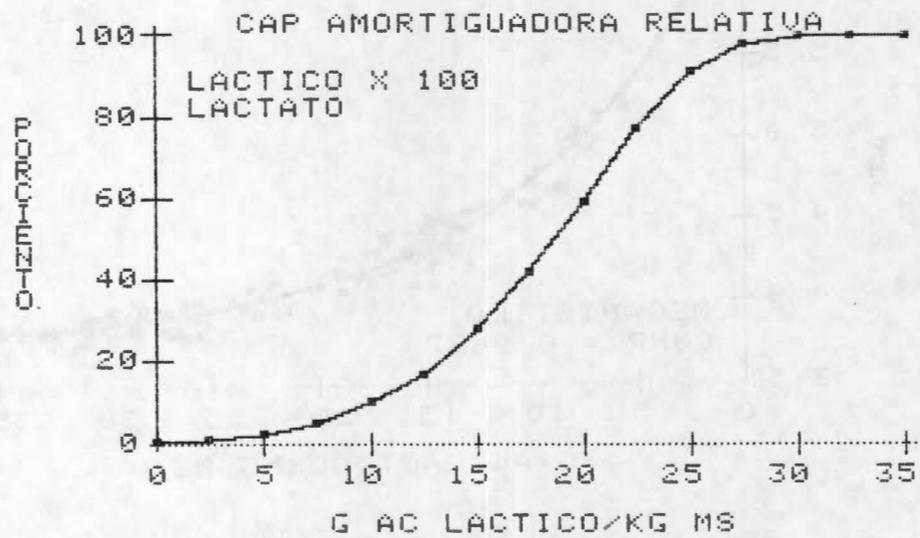


Fig 5.6 Variación de la relación ácido láctico/ lactato en el ensilaje de yuca dicionado con *Lactobacillus casei* en función de la Acidez Total Titulable (a) y del pH del medio (b).

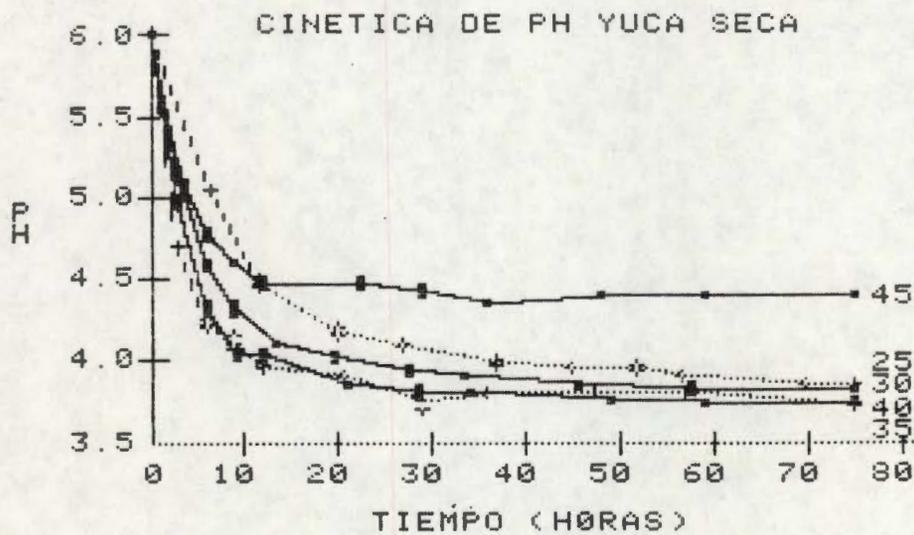
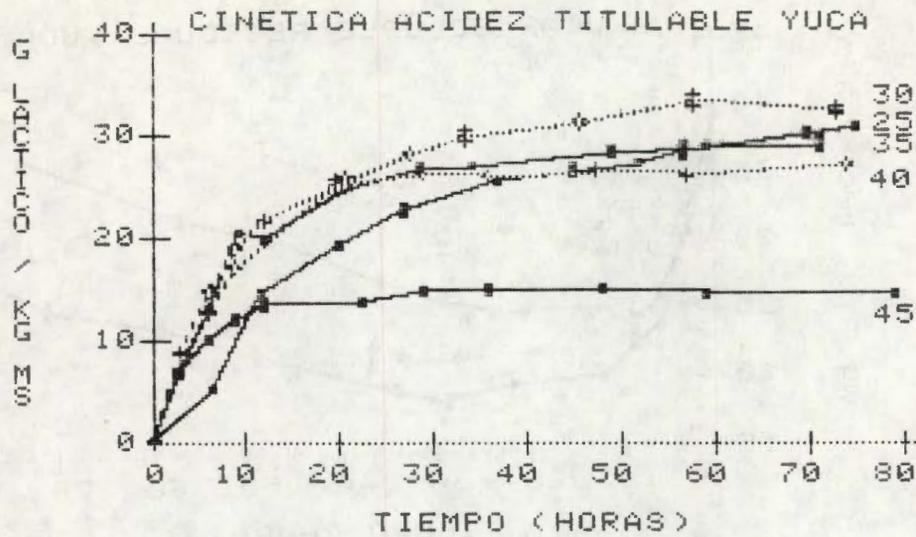


Fig 5.7 Cinética de acidez total titulable (a) y pH (b) del ensilaje de yuca en función de la temperatura, adicionado de 10 % V:P de *Lactobacillus casei*.

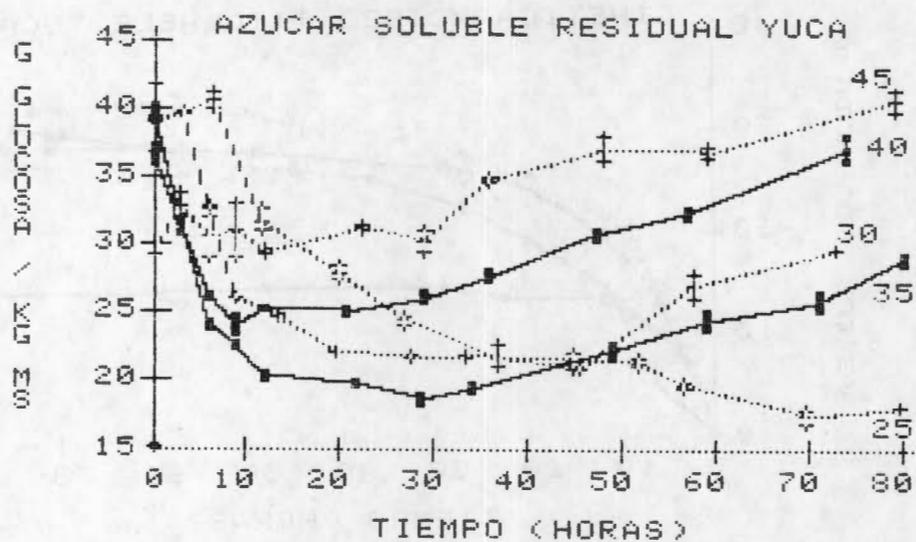


Fig 5.8 Variación del contenido de azúcares reductores en el ensilaje de de yuca a diferentes temperaturas, adicionado de 10 % V:P de *Lactobacillus casei*.

CAPITULO 6. SIMULACION Y ESCALAMIENTO DEL ENSILAJE

6.1 Simulación del ensilaje

La conservación de alimentos por ensilaje es un proceso que ha sido poco estudiado desde un punto de vista de bioingeniería y las aportaciones más importantes en el ensilaje han sido en nutrición animal, que es su principal aplicación.

En esta sección pretendemos contribuir al estudio del ensilaje desde un punto de vista de bioingeniería, concretamente planteando y comprobando modelos cinéticos para su simulación.

En este aspecto, los únicos antecedentes cercanos son los numerosos reportes acerca de la simulación del cultivo sumergido de la fermentación láctica (Ver 2.5.1), aun considerando las diferencias entre el cultivo sumergido y el sólido, decidimos considerar inicialmente estos modelos reportados previamente.

Estos modelos son conjuntos de ecuaciones diferenciales ordinarias simultáneas de primer orden y no lineales, con una serie de constantes relacionando a las variables: biomasa (X), sustrato (S) y producto (P). Para poder validar cualquiera de esos modelos es necesario contar con determinaciones precisas de X, S y P.

Debido a la poca sensibilidad de los métodos empleados en la determinación de la biomasa (Ver 5.3.5 y 5.5.4) no fue posible cuantificar el crecimiento microbiano en forma precisa. Esto impone una dificultad seria en la simulación ya que la biomasa es la parte activa catalítica de la fermentación. Por otro lado, la determinación de azúcares presentó cierta incertidumbre debido a la presencia de azúcares no reductores fermentables en la yuca (Ver 5.5.3).

Lo anterior dió lugar a un cambio de estrategia para la selección del modelo, haciendo consideraciones realistas acerca de las variables que es posible medir en el ensilaje de yuca. Se seleccionó al ácido láctico como la variable que sería útil para la simulación y que a la vez es sumamente importante para el ensilaje. Para validar este tipo de modelos contábamos con datos de cinéticas experimentales de ácido láctico en función del tamaño de inóculo y de la temperatura.

Examinando las gráficas de los datos experimentales (Fig. 5.1a y 5.7a) se observan algunas características comunes, es decir las curvas son de tipo asintótico sin cambio aparente de curvatura. Se probaron algunos modelos como logístico, ley de potencia y diversos modelos asintóticos (Draper y Smith, 1981 y Ratkowsky, 1983). Dos modelos dieron resultados satisfactorios.

El primero es una variación del modelo logístico pero sin simetría en el punto de inflexión, este modelo ha sido usado

para estudios poblacionales de animales, es decir el modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1981; Ratkowsky, 1983):

$$R_p = \frac{dP}{dt} = k P \log\left(\frac{A}{P}\right)$$

donde A representa a la formación máxima de producto y k es la constante específica de la fermentación. En su forma integrada el modelo se expresa como:

$$P = A \exp(-B \exp(-k t))$$

donde las condiciones iniciales (P_0) se pueden conocer a través de:

$$P_0 = \log(A - B)$$

El segundo es un modelo mecanístico, conocido como una función de monomolecular de acidificación, donde la velocidad de acidificación es directamente proporcional a la cantidad de ácido que se va a formar, este modelo es presentado por Draper y Smith (1981):

$$R_p = \frac{dP}{dt} = k (A - P)$$

donde A representa la concentración máxima de producto y k es la constante de reacción de la fermentación. En su forma integrada el modelo es:

$$P = A (1 - B \exp(-k t))$$

donde las condiciones iniciales (P_0) están dadas por:

$$P_0 = A (1 - B)$$

Los parámetros de ambos modelos fueron estimados por el método de Marquardt (1963), usando las expresiones integradas y datos de producto y tiempo, en la Tabla 6.1 y 6.2 se presentan los resultados de las regresiones no lineales para ambos casos.

Los dos modelos estudiados presentaron una predicción satisfactoria de los datos experimentales, reflejándose en promedios de las desviaciones de la predicción pequeños (Tabla 6.1 y 6.2).

Es importante hacer notar que el parámetro A en los dos modelos se refiere a la concentración máxima de ácido láctico, sin embargo no es posible establecer comparación entre las k's de los modelos, ya que en el caso de Gompertz se trata de una constante específica de acidificación, mientras que en el modelo mecanístico se trata de una constante de reacción, de

igual forma solo se puede decir que en el parámetro B estan incluidas las condiciones iniciales, aunque de diferente manera.

Tabla 6.1 Resultados de la estimación de parámetros del modelo de Gompertz aplicado a la cinética de ensilaje en función del inóculo y la temperatura.

	A	B	k	DT
Inóculo (%) @30 °C				
0	15.3566	5.7765	0.1336	1.01
1	27.1108	4.1598	0.2096	0.65
3	28.1144	3.0082	0.1685	0.68
5	28.3280	2.8825	0.1762	1.03
10	29.9765	2.4264	0.1624	1.87

Temperatura (°C) @10 % I ₀				
25	26.7710	3.2898	0.1252	1.05
30	29.9765	2.4264	0.1624	1.87
35	26.9847	2.8533	0.2219	1.55
40	26.1650	2.5770	0.2416	0.81
45	14.4625	2.4611	0.3336	0.49

DT : Promedio de las desviaciones en la predicción

Tabla 6.2 Resultados de la estimación de parámetros del modelo mecanístico aplicado a la cinética de ensilaje en función del inóculo y la temperatura.

	A	B	k	DT
Inóculo (%) @30 °C				
0	21.1725	1.0366	0.0288	2.81
1	29.5605	1.0570	0.0570	2.25
3	29.9539	1.0292	0.0786	0.54
5	30.1242	1.0182	0.0838	0.44
10	31.7873	0.9893	0.0844	0.10

Temperatura (°C) @10 % I ₀				
25	29.9371	1.0335	0.0528	1.23
30	31.7873	0.9893	0.0844	0.10
35	28.0952	1.0187	0.1129	0.96
40	26.7635	1.0067	0.1380	0.06
45	14.7160	0.9941	0.1989	0.10

DT : Promedio de las desviaciones en la predicción

La interpretación y aplicación del modelo mecanístico no resultan muy claras para el caso de la fermentación láctica,

ya que no es aplicable para un proceso autocatalítico como es la fermentación.

Por otra parte, el modelo de Gompertz tiene cierta analogía con la inhibición que se presenta en la fermentación láctica (Luedeking y Piret, 1959), ya que la forma no disociada (protonada) del producto es el principal inhibidor de la fermentación y esta forma iónica cambia en forma logarítmica con el pH, de ahí la justificación del término logarítmico del modelo de Gompertz. Por lo anterior decidimos seleccionar este último modelo para caracterizar la cinética del ensilaje de yuca inoculado con lactobacilos.

En las figuras 6.1 y 6.2 se pueden apreciar la comparación de los datos experimentales con la predicción del modelo de Gompertz en función del tamaño de inóculo y de la temperatura respectivamente, ahí se observa que el perfil del modelo sigue de cerca la tendencia de los datos experimentales durante las primeras horas de la fermentación, sin embargo al final de la fermentación el modelo predice valores menores en la concentración final de ácido (Tabla 6.3), esto es más notorio para 25, 30 y 35 °C y para 5 y 10 % de adición de inóculo.

Tabla 6.3 Efecto del tamaño de inóculo y la temperatura en la concentración máxima de ácido láctico observada y calculada por el modelo de Gompertz

	Producto máximo	
	Observado	Calculado (A)
<hr/>		
Inóculo (%V:P) @30 °C		
0	15.86	15.35
1	28.52	27.11
3	29.19	28.11
5	33.05	28.32
10	32.49	29.97
<hr/>		
Temperatura (°C) @10% I ₀		
25	30.68	26.77
30	32.38	29.97
35	31.41	26.98
40	26.60	26.19
45	14.80	14.46

El efecto de la inoculación en el modelo de Gompertz se ve reflejado en el aumento de los valores finales de ácido láctico (A) a medida que se incrementa la adición de lactobacilos (Tabla 6.3). Mientras que los valores de k de 3 a 5 % de inóculo se mantienen prácticamente constantes (Tabla

6.1), a excepción del caso de 1 % que consideramos se debe a problemas experimentales.

El efecto de la temperatura se refleja en la formación final de producto dando lugar a una curva con un máximo alrededor de 30 °C, pero los valores calculados son un poco menores a los encontrados experimentalmente (Tabla 6.3). Así mismo, los valores de k aumentan al incrementarse la temperatura en el rango estudiado, aplicando la ecuación de Arrhenius se obtiene un valor de 49 661 J/g mol para la Energía de activación, que está dentro del rango para procesos biológicos (Segel, 1976), para el caso del factor de frecuencia se obtuvo un valor de 28.237 E06, en la gráfica 6.3 se aprecia la dependencia de k con la temperatura.

Este modelo sencillo de la cinética del ensilaje tiene limitaciones fuertes al no contemplar a la biomasa, sin embargo el modelo de Gompertz es similar a los propuestos anteriormente (Keller y Gerhardt, 1975 y Aborhey y Williamson 1978) para simular la formación de producto en la fermentación láctica en cultivo sumergido:

$$R_p = \frac{dP}{dt} = k P f(P)$$

donde $f(P)$ es una función de inhibición, existiendo diferentes formas para este factor (Keller y Gerhardt, 1975; Aborhey y Williamson, 1978), pero en ningún caso para el ensilaje.

Además de manera práctica y usando la correlación dada en la sección 5.4.3 se puede relacionar fácilmente el pH del medio con la acidez total titulable:

$$P = -\frac{1}{K} \ln \left(\frac{pH - a}{a b} \right)$$

donde K , a y b son las constantes referidas en la sección 5.4.3.

Así de manera sencilla, es posible seguir el desarrollo del ensilaje en el caso de un patrón homoláctico, y obtener más datos experimentales para corregir este modelo en su extrapolación a escala industrial.

Los modelos desarrollados para el ensilaje pueden servir para la simulación y diagnóstico del proceso usando sistema expertos.

6.2 Escalamiento del ensilaje

Dado lo anterior en este momento contábamos con un modelo cinético sencillo del ensilaje en función de la temperatura y del tamaño de inóculo, elementos importantes para la simulación y diseño de silos industriales.

Por otra parte, durante la práctica del ensilaje se reporta calentamiento de la masa, sin embargo no existen reportes donde se estudie de manera sistemática este fenómeno a escala industrial (SARH, 1984).

Por lo tanto, como metodología de estudio establecimos que los silos de grandes dimensiones podrían estudiarse mediante un balance de energía, usando un modelo pseudohomogéneo dinámico y unidimensional (Froment, 1972), en forma similar al empleado en 4.3.2.

Para este propósito se diseñaron diferentes bioreactores (Ver 3.1.7) con la finalidad de obtener datos experimentales para validar un modelo del ensilaje que fuese aplicable a escala industrial, así se procedió a realizar el escalamiento del proceso.

Previo a los ensayos se hicieron algunas consideraciones termodinámicas, así para un ensilaje homoláctico (vía EMP, Doelle, 1975) con 60 % de humedad se estimó que si la cantidad de ácido láctico formado fuese de 3 % (de acuerdo a nuestros resultados del capítulo 5), la temperatura máxima adiabática sería de 5.7 °C aproximadamente. Por otra parte, suponiendo las mismas condiciones y el mismo consumo de azúcares (4 % BS), pero en el caso de una fermentación heteroláctica (vía HMP, Doelle, 1975), la temperatura máxima adiabática sería de 4.2 °C. En el caso de considerar la vía de fosfoacetolasa (Doelle, 1975) para la fermentación heteroláctica sería de 18.5 °C. Es importante mencionar que estos cálculos depende fuertemente del contenido de humedad del medio ya que afecta el valor de la capacidad calorífica.

Esta información teórica indicaba que probablemente el ensilaje no se calentaría significativamente debido a una fermentación homoláctica o heteroláctica con la presencia de etanol (EMP), sin embargo una fermentación heteroláctica vía fosfoacetolasa, es decir con la presencia de ácido acético, podría calentar el medio.

Dadas estas consideraciones era necesario confrontar estos resultados teóricos con datos experimentales. Para este propósito nos propusimos realizar el escalamiento, poniendo atención en los problemas de generación y transferencia de calor, así nuestras instalaciones permitieron realizar el escalamiento del ensilaje hasta un nivel de 100 kg.

Durante el escalamiento del ensilaje de yuca adicionado de lactobacilos al 10 % V:P, se estudiaron microsilos a niveles de 1, 15, 40 y 90 kg con relaciones L/D de 6, 3, 3, y 0.6 respectivamente, como se indica la Tabla 3.2 y en la sección 3.1.6. La relación L/D fue disminuyendo pasando de 6 hasta 0.6,

a la vez que se aumentaba la cantidad de material pasando de 1 a 90 kg respectivamente.

Los prototipos experimentales fueron mantenidos en cámaras con temperatura regulada a 33 ± 3 °C, a excepción del caso de 1 kg que se mantuvo a 30 °C, en todos los casos se registró la variación de la temperatura durante la fermentación. El análisis de la acidez total titulable fue alrededor de 3 % BS para todos los casos, suficiente para lograr la conservación.

En los diferentes microsilos estudiados, no se observaron gradientes de temperatura importantes entre el centro y la pared del fermentador, como se puede observar en la Fig 6.4., la temperatura de la masa tendió a la temperatura del medio ambiente a medida que la fermentación procedía. Así se confirmó que la fermentación homoláctica o pequeñas desviaciones de ella, no libera el suficiente calor para elevar la temperatura de la masa del ensilaje hasta un nivel de 100 kg aproximadamente.

Pensando que el fenómeno de calentamiento podría deberse a la respiración residual del tejido vegetal se realizó el ensilaje con yuca fresca y yuca seca a nivel de 40 kg y L/D de 3, sin embargo en ninguno de los dos casos se observaron gradientes de temperatura importantes como se aprecia en la figura 6.5. Indicando que la respiración residual del tejido vegetal, en estas condiciones, tampoco origina un calentamiento importante en la masa.

En este momento es posible establecer ciertas hipótesis acerca del fenómeno de calentamiento observado a escala industrial, que en cualquier caso requiere mayor estudio.

Bajo condiciones reales la heterogeneidad del medio puede ocasionar la formación de espacios vacíos, donde una fermentación acética puede ser favorecida y el desprendimiento de calor ser importante.

Es posible que la escala a la cual se hicieron los ensayos sea demasiado pequeña para detectar elevaciones importantes de temperatura, por lo que sería necesario estudiar este fenómeno en los lugares donde se presenta, tomando en cuenta el patrón fermentativo y posiblemente también aspectos fisiológicos postcosecha.

6.3 Conclusion

La cinética de acidificación del ensilaje de yuca adicionado de *Lactobacillus casei* fue caracterizada en función del tamaño de inóculo y de la temperatura mediante la adaptación del modelo de Gompertz a la formación de ácido láctico, tomando como variable únicamente al producto.

Este modelo cinético y la correlación de pH con la acidez total titulable permiten el seguimiento del desarrollo del ensilaje homoláctico en escala industrial, y abre la oportunidad para futuros estudios en este tema.

Por otra parte, se determinó que la fermentación homoláctica y heteroláctica no desprenden suficiente calor para elevar significativamente la temperatura durante el ensilaje hasta una escala de 100 kg.

Esto indica que se requiere mayor trabajo de campo para estudiar el fenómeno de calentamiento en silos industriales, considerando tal vez aspectos fisiológicos postcosecha y la aplicación de lactobacilos en el ensilaje de yuca posiblemente deberá contemplar el empleo de cepas termotolerantes.

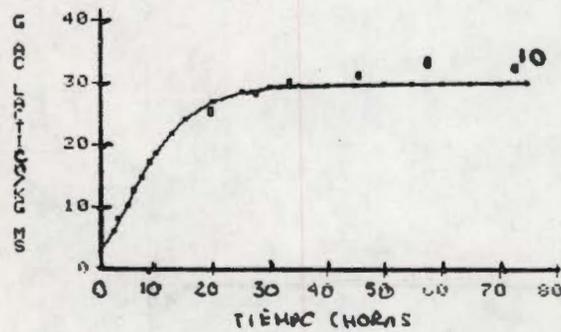
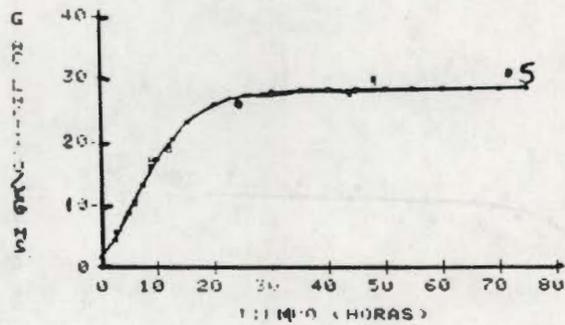
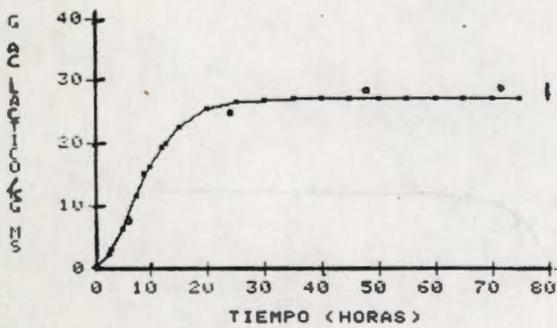
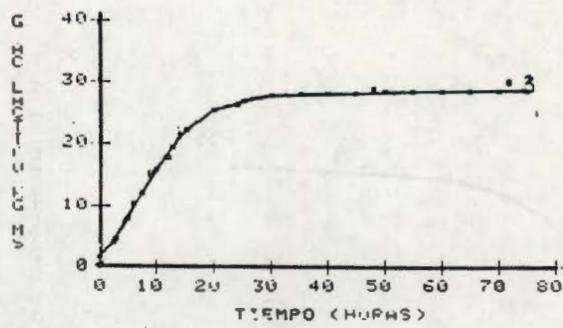
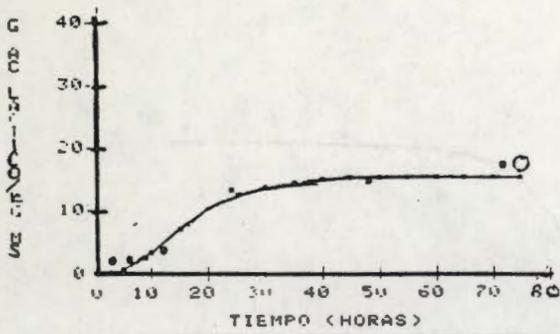


Fig. 6.1 Dependencia de la cinética del ensilaje de yuca con el tamaño de inóculo (% V:P) de *Lactobacillus casei* (+ Datos experimentales, - Modelo Gompertz).

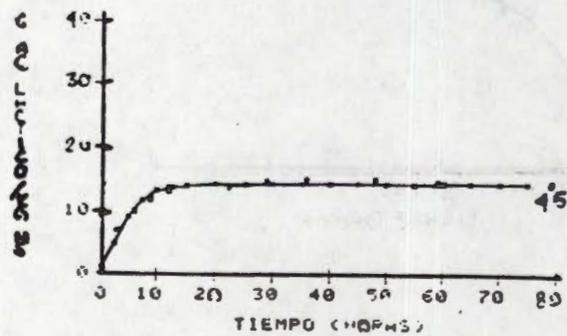
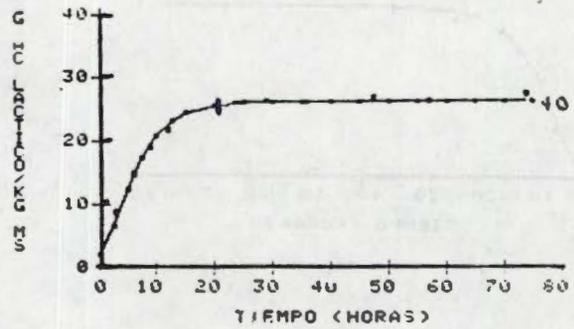
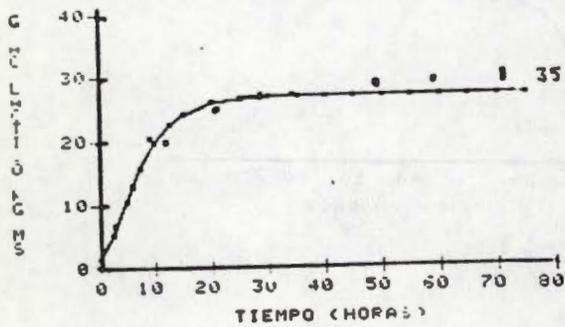
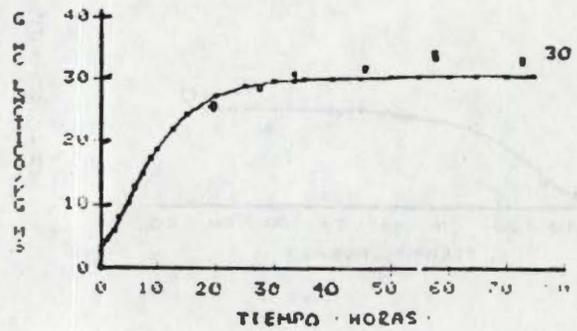
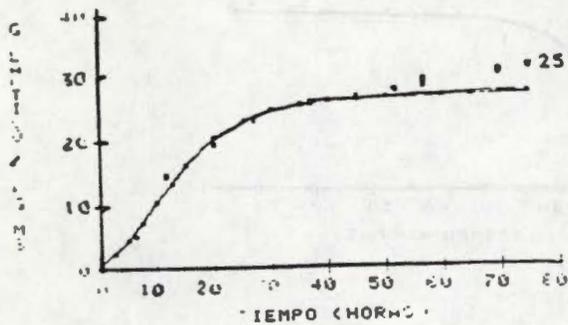


Fig 6.2 Dependencia de la cinética de acidificación del ensilaje de yuca adicionado de *Lactobacillus casei*, con la temperatura (°C), (+ Datos experimentales, - Modelo Gompertz).

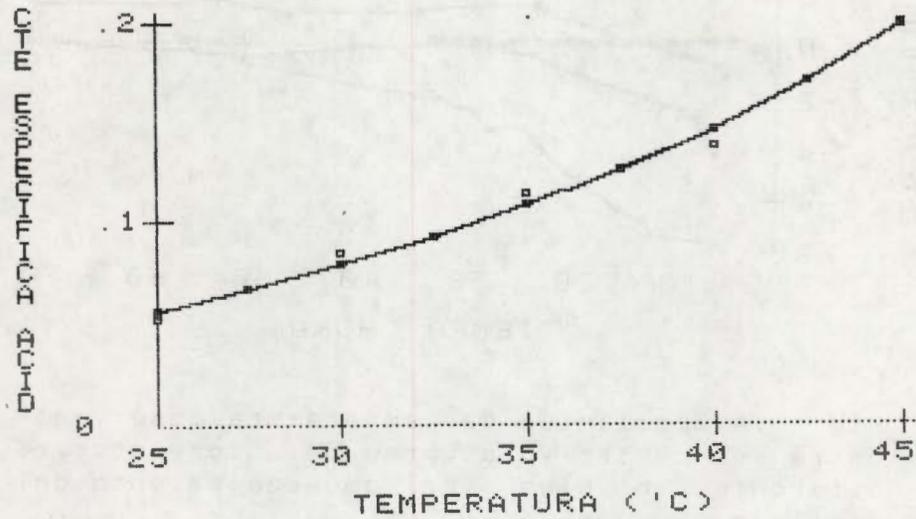


Fig 6.3 Dependencia de la constante específica de acidificación del modelo de Gompertz con la temperatura (+ Datos experimentales, - Modelo Arrhenius).

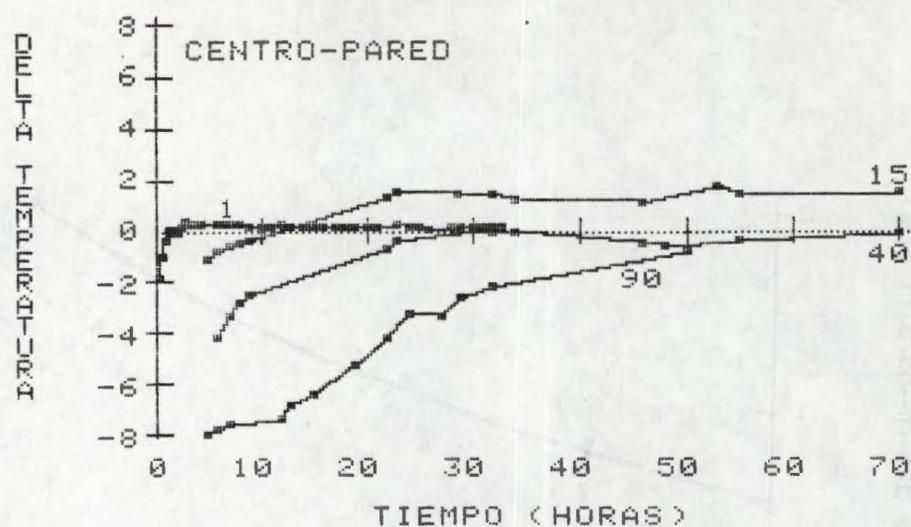


Fig 6.4 Gradientes de temperatura observados entre el centro y la pared del bioreactor, a diferentes niveles (kg) de escalamiento del ensilaje de yuca.

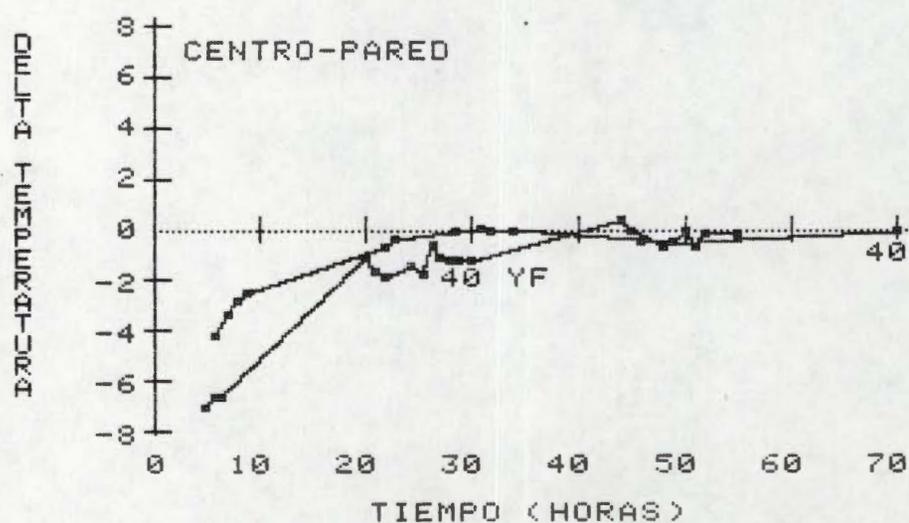


Fig 6.5 Gradientes de temperatura observados entre el centro y la pared del bioreactor, en el ensilaje realizado con yuca fresca y yuca seca a nivel de 40 kg.

CAPITULO 7. CONCLUSION GENERAL

En este trabajo se proponen alternativas a los problemas de utilización de la yuca (*Manihot esculenta*) mediante la Fermentación Sólida, cubriendo aspectos novedosos y prácticos de bioingeniería.

Concretamente se estudió el enriquecimiento protéico y el ensilaje de la yuca para resolver los problemas de bajo contenido de proteínas y conservación en húmedo, respectivamente.

Los resultados se pueden dividir en dos partes fundamentales:

a) Enriquecimiento protéico

Dado el amplio antecedente microbiológico existente en el cultivo de *Aspergillus niger* en medio sólido, se planteó y validó un modelo matemático de transferencia y generación de calor pseudohomogéneo dinámico unidimensional. Los números adimensionales (Pe y Bi) estimados fueron muy altos y se concluyó que el mecanismo de transferencia de calor es esencialmente conductivo.

El modelo puede servir para la simulación, diseño y escalamiento de reactores estáticos, con geometrías cilíndrica, cartesiana y toroidal, posiblemente también para reactores dinámicos con agitación intermitente, así mismo con modificaciones el modelo se puede adaptar a otros sistemas de soportes y microorganismos, como al caso de bagazo de caña impregnado.

Finalmente, este modelo puede ser útil para el control de fermentadores en medio sólido donde los productos recuperables sean valiosos.

b) Ensilaje

El antecedente microbiológico del ensilaje de yuca fue deficiente por lo que se realizó un trabajo muy extenso en este sentido y finalmente se avanzaron algunas ideas sobre la simulación y escalamiento de este proceso.

El amplio trabajo microbiológico realizado permitió establecer una metodología experimental para el estudio del ensilaje de materiales amiláceos.

El efecto principal de la adición de lactobacilos al ensilaje de yuca, se refleja en un cambio del patrón heterofermentativo observado en la fermentación espontánea, hacia un patrón homofermentativo, lo que implica disminución de pérdidas por la formación de productos ligados a la putrefacción. Se determinó que un inóculo de 1 % (V:P) era suficiente para llevar a cabo el ensilaje.

La adición de cultivos de bacterias lácticas al ensilaje

aumenta la cantidad de ácido láctico formado hasta en un 75 %, y aumenta la velocidad de acidificación hasta en un factor de 1.8 comparado con los silos fermentados con la flora natural. Así los valores de pH alcanzados son menores a 4, en los silos inoculados, asegurando la conservación del material amiláceo.

La acidificación se realiza en forma mas eficiente en silos inoculados, en términos del consumo de sustrato, los rendimientos globales aparentes Y p/s observados fueron de 0.73, significando un incremento de 80 % respecto a los no inoculados.

En términos de los criterios bioquímicos estudiados en la fermentación del ensilaje, es poca la diferencia entre utilizar yuca fresca o yuca seca como materia prima de las experiencias, lo cual facilita el método de estudio de este sistema.

Si existe interés en evaluar el crecimiento bacteriano en el ensilaje deben buscarse métodos más sensibles para la evaluación de la biomasa de bacterias lácticas.

El pH es un factor muy importante para la fermentación láctica se encontró que en un rango amplio (5 a 8) de pH inicial se puede llevar a cabo el ensilaje con éxito.

Al aumentar el tamaño de partícula la acidificación se ve desfavorecida.

Los requerimientos de calcio y nitrógeno de la fermentación del ensilaje de yuca están cubiertos por la materia prima.

La adición de 10 a 15 por ciento de bagazo de caña BS aumenta la concentración de ácido láctico un 25 por ciento. Posiblemente debido a la capacidad de absorción de agua y a los azúcares residuales del bagazo. Sin embargo esta es una práctica poco común en los silos industriales.

La temperatura tiene un efecto muy importante en las velocidades de la fermentación del ensilaje, así como en la acumulación final de ácido láctico. A este respecto las condiciones óptimas en un silo inoculado con *L. casei* oscila entre 30 y 35 °C, también se observó que el patrón homofermentativo se desvía a medida que la temperatura se aleja del óptimo.

Con el antecedente microbiológico realizado en este trabajo se simuló la cinética de acidificación del ensilaje adicionado de lactobacilos.

La cinética fue caracterizada en función del tamaño de inóculo y de la temperatura mediante la adaptación del modelo de Gompertz, tomando como variable unicamente al ácido láctico.

Este modelo cinético y la correlación de pH con la acidez total titulable permiten el seguimiento del desarrollo del ensilaje homoláctico en escala industrial y abre la oportunidad para futuros estudios en este tema.

Por otra parte, se determinó que la fermentación homoláctica y heteroláctica no desprenden suficiente calor para elevar significativamente la temperatura durante el ensilaje hasta una escala de 100 kg.

A partir de datos teóricos y resultados experimentales se determinó que se requiere mayor trabajo de campo para estudiar el fenómeno de calentamiento en silos industriales y la aplicación de lactobacilos en el ensilaje de yuca posiblemente deberá contemplar el empleo de cepas termotolerantes.

El diseño adecuado de los silos y la conservación de la yuca por ensilaje, usando bacterias lácticas, presenta datos experimentales prometedores, que merecen ser evaluados a escala comercial, como una alternativa importante en la disminución de pérdidas postcosecha en este producto.

Los dos tipos de fermentaciones sólidas aquí estudiadas, son sumamente diferentes, ya que uno se trata de un proceso aerobio con hongos, mientras que el otro es anaerobio con bacterias. Al inicio de este trabajo se partió de antecedentes directos muy diferentes para ambos procesos, en resumen y desde un punto de vista de bioingeniería se lograron los siguientes puntos sobresalientes:

Para el enriquecimiento se estableció un metodología de estudio de bioreactores orientada al escalamiento racional y cuantitativo, basado en números adimensionales, similar a reactores catalíticos y que permitirá aplicaciones con otros materiales, microorganismos y bio-reactores.

Para el caso del ensilaje se destaca la conveniencia de utilizar pequeños inóculos de bacterias lácticas para favorecer una fermentación adecuada. La cinética se caracterizó usando un modelo sencillo que permitirá avanzar en futuros estudios a escala industrial.

Los futuros trabajos en esta rama tal vez deban orientarse al estudio de diferentes microorganismos aplicables al ensilaje, así como al diseño de medios de cultivo para la producción de inoculantes.

CAPITULO 8. REFERENCIAS

Aborhey S. and D. Williamson (1977), Modeling of lactic acid production by *Streptococcus cremoris* HP, *J. Gen. Applied. Microbiol.*, 23:7.

Adegbola A.A. (1977), Methionine as an addition to cassava-based diets, in B. Nestel and M. Graham, ed., *Cassava as Animal Feed: Proceeding of a Workshop held at the University of Guelph, 18-29 April, 1977* (International Development Research Centre, Ottawa, Canada), pp 9-17.

Aiba S., A.E. Humphrey and N.F. Millis (1978) *Biochemical Engineering*", 2ed., Academic Press Inc., New York.

Aiba, S. ,M. Shoda and M. Nagatani (1968) Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation, *Biotech & Bioeng.*, 10:845.

Appan S.G. et al (1970) A strategic program for genetic Engineering of Cassava, in *Tropical Root and Tuber Crops Tomorrow*, vol. 1, *Proceedings of 2nd International Symposium on Tropical Root and Tuber Crops*, (Ibadan, Nigeria, 1970), pp. 79-82.

Association of Officials Agricultural Chemist (1980), *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Assoc. Offic. Agric. Chem., Washington DC.

Bailey J.E. and D.F. Ollis (1977) *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw Hill-Kagakusha LTD, Tokyo.

Bajracharya R. & Mudgett R. (1980), Solid substrate of alfalfa for enhanced protein recovery, *Biotech & Bioeng*, 22:2219.

Barker S.B & Summerson W.H. (1941) The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material, *J. Biol. Chem.*, 138:535.

Barnes T.G., Eggins H. W. & Smith E.L. (1972) Preliminary stages in the development of a process for the microbial upgrading of waste paper. *International Biodeterioration Bull.*, 8:112.

Barnett A.J.G. (1951) The colorimetric determination of lactic acid in silage, *Biochem J.*, 49:527.

Battisti R.C., Batista C.M., Coelho D.T. Teles F.F. & Silveira A.J. (1981) Determinacao de carboidratos soluveis redutores e nao redutores em cultivares de mandioca, *Revista Ceres*, 28:312.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1974, R.E, Buchanan and N.E. Gibbon Ed., 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. USA.

- Briggs & Haldane (1925) *Biochem J.* 19:338, en Segel (1976)
- Bovee J.P., Strehaiano F., Goma G. & Sevely Y. (1984) Alcoholic Fermentation: Modeloing based on sole substrate and product measurement, *Biotech & Bioeng.* 26:328.
- Chance (1943) *J. Biol. Chem.*, 151:553, en Segel (1976).
- Carberry J. (1976) Chemical and Catalytic Reaction Engineering, Mc Graw Hill, New York.
- Carnahan B., Luther H.A. & Wilkes J.O. (1969) Applied Numerical Methods, John Wiley, New York.
- Carrizales V., Rodriguez H, and Sardiña I (1981) Determination of the specific growth of molds on semisolid cultures, *Biotech & Bioeng.* 23:321
- Castrillón M., Shimada A., y Calderón F. (1978) Manipulación de la fermentación en ensilajes de caña de azúcar y su valor alimenticio para borregos. *Tec Pec. Mex.*, 35:48.
- Collard P. and Levi S. (1959) A two stage fermentation of cassava, *Nature*, 183:620
- Coursey D.G. and P. H. Haynes (1970), "Roots crops and their potencial as food in the tropics", *World crop*, 261-265.
- Cruichshak R. Duguid, Marmion B.P. & Swain R.H. (1975) Medical Microbiology, 12 ed., Churchill Livingstone.
- Cruz C. (1984), "Obtención de harina integral de yuca, Memoria Reunión UAM-CINVESTAV, 29 Mayo 1984, México D.F.
- Dean A.C.R. and C.N. Hinshelwood (1966) Growth function and regulation in bacterial cells, Oxford U. Press, London.
- Delange F. M. van Der Velden, and A.M. Ermans, Evidence of an anti-Thyroid action of cassava in man and animals, in Nestel and MacIntyre, eds., Chronic Cassava Toxicity, pp 147-157, en Okigbo 1980
- De Vries C.A., J.D. Ferwenda and M. Flach (1967), "Choice of foods crops in relation to actual and potencial production in the tropics", *Netherl. J. Agric. Sci.*, 5:241
- Doelle H.W. (1975) Bacterial Metabolism, Academic Press, New York.
- Draper N.R. & Smith H. (1981) Applied REgression Analysis, John Wiley, New York.
- Edwards V. H. & Wilke C.R. (1968) Mathematical representation of

batch culture data, *Biotech & Bioeng.*, 10:205.

Ekpechi O.L., Endemic Goitre and high Cassava diets in Eastern Nigeria in Nestel and MacIntyre, ed., *Chronic Cassava Toxicity*, pp. 139-145, en Okigbo 1980.

Ely L.O., Moon N.J. and Sudweeks E.M. (1982) Chemical evaluation of *Lactobacillus* addition to Alfalfa, Corns, Sorghum and Wheat Forage at Ensiling, *J. Dairy Sci.*, 65:1041

Esener A.A., J.A. Roels and N.W. Kossen (1981) The influence of temperature in the maximum specific growth rate of *K. neumanniae*, *Biotech & Bioeng* 23:1401.

Finger S.M., Hatch R.T., Regan T.M. (1976) Aerobic Microbial Growth in Semisolid matrices: Heat and Mass transfer limitations, *Biotech & Bioeng* 28:1193.

Finlayson B.A. (1971) Packed Bed Reactor Analysis by Orthogonal collocation, *Chem Eng Sc.* 26: 1081.

Finlayson B.A. (1974) Orthogonal collocation in Chemical Reaction Engineering, *Cat Rev* 10: 69.

Finlayson B.A. (1980) *Non Linear Analysis in Chemical Engineering*, Mc Graw Hill, New York.

Flieg O. (1938) *Futterbau a. Garfutterbereitung* 1:121

Flores Galarza R.A., Glatz B.A., Bern C.J. and Van Fossen L.D. (1985) Preservation of High Moisture Corn by Microbial Fermentation, *J. of Food Protection*, 48:407

FAO, Food and Agricultural Organization (1972), *Production Yearbook*, Rome.

Food and Agricultural Organization (1977) *Production Yearbook*, Rome.

Fredrickson A.G., R.D. Meggee III and H.M. Tsuchiya (1970), Mathematical models for fermentation processes, *Adv. Appl. Microbiol.*, 23:419

Froment G.F. (1972) Analysis and design of fixed bed catalytic reactors, *Chemical Reaction Eng.*, Advances in Chem. Series No. 109, American Chemical Society.

Gómez Hernández J. and Coronado Vega B. (1983) Lactic acid production using animal wastes as inoculum, *Biotech. Letters*, 5:629

Gómez Hernández J. y Viniegra González G. (1977)

Extracción del ácido ribonucleico (ARN) de *Sacharomyces cerevisiae* en condiciones alcalinas suaves, *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 21:97

Gómez H.J. and Viniestra-González G. (1981), Orientation of sugar fermentation inoculated with microbial population from cow dung, *Adv. Biotechnol.*, 2:627

Gray A.D. (1970) *Critical Reviews in Food Technology*, CRC Press.

Han Y.W. & Anderson A.W. (1975) Semisolid fermentation of rye grass straw *Applied Microbiol.*, 30:4.

Hanson T.P. and G.T.Tsao (1972) Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures, *Biotechnol. & Bioeng.* 14:233.

Hendershot C.H. et al. (1972) A literature Review and research recommendations on Cassava (*Manihot esulenta*, Crantz)U, Georgia, Athens, Georgia USA.

Hesseltine C.W. (1972), Solid state fermentation, *Biotech & Bioeng.*, 14:517.

Himmelblau D.M. (1969) *Process Analysis by Statistical methods*, John Wiley, New York.

Hlavacek Vladimir (1970) Aspects in Design of Packed Catalytic Reactors, *Ind. Eng Sc.*, 62:8.

Holmberg A. and J. Ranta (1979), Procedures for the parameter and state estimation of microbial process models, Proc. IFAC, Symposium on Identification and System Parameter estimation, Darmstadt, F.R. Germany.

Huerta Ochoa S. (1984) Efecto de la transferencia de masa y acumulación de calor metabólico en la fermentación de cultivos sólidos. Tesis Maestría Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Depto de Ing. Procesos e Hidráulica.

Kehoe J.P.G. & Butt J.B. (1972) Interactions of inter and intraphase gradients en a diffusion limited catalytic reaction *AIChE J.*, 18:347.

Kay D.E. (1973) *Root Crops*, Tropical Products Institute, London.

Keller K. & Gerhardt P. (1975) Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein, *Biotech & Bioeng* 17:997

Knapp J.S and J.A. Howell (1978) Solid substrate fermentation. in

Topics in enzyme and fermentation technology. Wiseman, 4: 85-135

LANFI, Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (1986) Resumen del Taller de Coordinación "La fermentación de la yuca (*Manihot esculenta*) y su aplicación en la industria alimentaria, 31 Octubre 1986, México D.F.

Lehninger A.L. (1972) Biochemistry, Worth Pub., New York.

Lindgren S. and Pleje N. (1983) Silage fermentation of fish or fish waste products with lactic acid bacteria, *J. Sci. Fd. Agric.*, 34:1057

Lonsane B.K., Ghildyal N.P. Budiartman S. & Ramakrishna J. (1985) Engineering aspects of solids state fermentation, *Enz. Microb. Technol.*, 7:258.

Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall M.R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193:265.

Luedeking R. and E.L. Piret (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation, *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 1:393.

Marquardt D.L. (1963) An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters, *J. Soc. Ind. Appld. Math.*, 11:431.

McCullough M.E. (1977) Silage and Silage Fermentation, *FeedStuff*, March 28

McDonald P. and Henderson A.R. (1974) The effect of fatty acids in silage fermentation, *J. Sci. Fd. Agric.* 25:791

Michaelis & Menten (1913) *Biochem J.* 49:333, in Segel 1976.

Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analyt. Chem.* 31:426.

Monod J. (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, *Herman et Cie*, Paris.

Moon N.J. (1981) Effect of inoculation of vegetable processing wastes with *Lactobacillus plantarum* on silage fermentation, *J. Sci. Fd. Agric.*, 32:675.

Moon J.N., Ely L.O. and Sudweeks M.E. (1981) Fermentation of wheat, Corn and Alfalfa Inoculated with *Lactobacillus acidophilus* and *Candida* sp at Ensiling, *J. Dairy Sc.*, 64:807.

Moo- Young M., Daugulis A.J., Chahal D.S. & McDonald D.G. (1979)

The Waterloo process for SCP production from waste biomass, *Biotech & Bioeng*, 21:593.

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

Ohyama Y., Masaki S. & Hara S. (1975) Factors influencing deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos, *J. Sci. Fd. Agric.*, 26: 1137.

Ohyama Y., Morichi T., Masaki S. (1975) The effect of inoculation with *Lactobacillus plantarum* and addition of glucose at ensiling on the quality of aereated silages, *J. Sci Fd. Agric*, 26:1001.

Okasaki N., Sugama S. & Tanaka T. (1980) Mathematical model for surface culture of koji mold, *J. Ferment. Tech.*, 58:471.

Okigbo B.N. (1980) Nutritional implications of projects giving high priority to the production of staples of low nutritive quality. The case for Cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) in the humid tropics of West Africa", *Food and Nutrition Bulletin*, 2:1

Osuntokun B.D., Ataxic Neuropathy Associated with High Cassava Diets in West Africa, in Nestel an MacIntyre, ed., *Chronic Cassava Toxicity*, pp. 127-128, en Okigbo 1980.

Pamment N.C., Robinson C.W., Hilton J. & Moo Young M. (1978) Solid state cultivation of *Chaetamium cellulolyticum* on alcali-pretreated sawdust, *Biotech & Bioeng*, 20:1735.

Pathak N.N., Mohan K. & Ranjhan (1974) Voluntary intake and nutritives value of silage made of poultry droppings and green maize, *Indian J. Anim. Sci.* 45:934.

Phillips T.P. (1974) Cassava utilisation and potencial Markets, International Development Research Centre, Ottawa, Canada.

Pipyn P. and W. Verstraete (1981), Lactate and ethanol as intermediate in two-phase anaerobic digestion, *Biotech & Bioeng*, 23:1145.

Pirt S.J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation, Blackwell Sci. Pub., London.

Poole L, MC Niff M, Cook S. (1981) Apple II Guia de Usuario, Mc Graw Hill, México.

Pozo M.C.de la Tijera (1983), "Fermentación láctica para la conservación de alimentos fermentados. Ensilaje de *Manihot*

esculenta enriquecida con *A. niger*". Tesis de licenciatura, Fac. de Biología. UNAM.

Pursglove J.W. (1968), Dicotyledon, vol 1, Tropical Crops Series, Longmans, Green & Co., London.

Raimbault M. (1980) Fermentation in Melieu solide, These Docteur d'Etat, U. Paul Sabatier Toulouse, France.

Raimbault M. & Alazard D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation, *Europ. J. Applied Microb. and Biotech.*, 9:199.

Ratkowsky D.A. (1983) Non Linear Modeling, Marcel Dekker Inc., New York.

Rogers P.L. Bramall L. & McDonald I.J. (1978) Kinetic analysis of batch and continous culture of *Streptococcus cremoris* HP *Can. J. Microbiol.*, 24:372.

Rogers L.A. & Whittiers E.D. (1928) *J. Bacteriol.* 16: 211.

Rose A.H. (1972), Microbiologia química. Ed. Alhambra, 2a. Ed., Madrid.

Roussos S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par Fermentation en Milieu Solide. These Docteur es-Sciences Naturelles, U. de Provence, France.

Ruxton B.I, & McDonald P. (1974) The influence of oxigen on silage, *J. Sci. Fd Agric.*, 25:107.

SARH, Primer Seminario Nacional sobre Yuca. Perpectivas de cultivo en México, , 14-16 Junio 1984, México D.F.

Sefa-Debeh S., (1984), "An old processing method, a new protein food", *Food and Nutrition Bulletin*, 6:1:77

Segel I. (1976) Biochemical Calculations, John Wiley, 2nd Ed., New York.

Senez J.C., *Food & Nutrition Bulletin* 2:2 (1979)

Sharpe E.M. (1981) The Genus *Lactobacillus*, in The Prokaryotes, M.P. Starr et al ed., Springer Verlag Berlin.

Shimada A. (1981) Empleo de forrajes de corte ensilados en la alimentación de rumiantes. *Ganadero* 6:1

Singer S.M., Hatch R.T. & Regan T.M. (1976) Aerobic microbial growth in semisolid matrices: Heat and mass transfer limitation, *Biotech & Bioeng.*, 18:1193.

Steel R.G. and Torrie J. (1970) *Statistical Analysis*, Mc Graw Hill, New York

Takamatsu T., S. Shioya and K. Okuda (1981), "A comparison of unstructured growth models of microorganism", *J. Ferment. Technol.*, 59:131.

Teles F.F., Oliveira M.L., Silveira A.J., Fabris J.D. & Batista C.M. (1979) Carboidratos solúveis redutores e não redutores de dez clones de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) cultivados em Minas Gerais, *Revista Ceres*, 26:513.

Teles F.F., Silveira A.J., Batista C.M. Feitosa E.P. & Resende J.L. (1980) Açúcares solúveis em mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz), *Revista Ceres*, 27:325.

Tsuchiya H.M. , A.G. Fredrickson and R. Aris (1966) Dynamics of microbial cell population, *Adv. Chem. Eng.*, 6:125.

Torre de la, I., and G. Goma (1980) Characterization of anaerobic culture with high activity, *Biotech. & Bioeng.*, 23,185.

University of Nebraska report (1978), *World Farming*, 20:14

Vandergeten J.P. & Vanstallen (1979) La valorisation de un sous-produit de sucrerie: la pulpe suspressée. *I.B.A.B.* 3:119

Van Wyk H.J. and Heydenrych M.S.C. (1985) The production of naturally fermented fish silage with various lactobacilli and different carbohydrates sources, *J. Sci. Food Agric.*, 36:1093

Velázquez Corona R. y Pozo de la Tijera C. (1983) Reporte de interno de investigación de la UAM-I.

Viesturs et al (1981) Solid state fermentation of wheat straw, *Biotech & Bioeng.*

Wang I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E & Lilly M.D (1979) *Fermentation and Enzyme Technology*, John Wiley, New York.

Williams F.M. (1967) A model of cell growth cell dynamic, *J. Theoret. Biol.*, 15:190.

Whittenburg R. (1961), An investigation of the lactic acid bacteria", Ph. D. Thesis, U. of Edinburgh.

Yusaku F., Masafumi O and S. Veda (1985) Ethanol Fermentation of raw cassava starch with *Rhizopus koji* in a gas circulation type fermentor, *Biotech & Bioeng.*, 27:1270.

Zaragoza L.(1984) Proposición de una tecnología para el desarrollo de la porcicultura tropical, en Primer Seminario Nal. sobre yuca. Perspectivas del cultivo en México. 14-16 Junio México.

AFENDICE I

**CLASIFICACION, METODOLOGIA
Y
ESTIMACION DE PARAMETROS
EN MODELOS**

AFENDICE I

CLASIFICACION, METODOLOGIA Y ESTIMACION DE PARAMETROS EN MODELOS

CONTENIDO

1. CLASIFICACION DE MODELOS	114
2. METODOLOGIA DE DESARROLLO DE MODELOS	115
3. ESTIMACION DE PARAMETROS	116

1. Clasificación de modelos

De acuerdo a las áreas del conocimiento es posible establecer diferentes clasificaciones de modelos matemáticos (Fig. 1), para el caso de bioingeniería y siguiendo las recomendaciones de Tsuchiya et al. (1966) y Himmemblau (1969) se pueden establecer dos grandes clases de modelos en las ciencias naturales: Determinísticos y Estocásticos, la mayoría de los modelos en esta área del conocimiento son determinísticos ya que hay una relación directa de causa y efecto, mientras que los estocásticos se basan en las probabilidades y distribuciones relacionadas con los eventos.

Los modelos determinísticos son los que su hipótesis se cumple invariablemente bajo una gran cantidad de contextos, son tal vez los que pueden elevarse a la categoría de ley (Modelos geométricos, tiro hiperbólico, caída libre de cuerpos, etc.).

Los modelos estocásticos pueden ser a su vez empíricos (regresiones lineales, multilíneas) y mecanísticos (biológicos), en esta clase de modelos se asume que el comportamiento de las variables involucradas sigue una cierta funcionalidad, sin embargo existen desviaciones que se incluyen dentro de un cierto error. Esto puede ser por ignorancia del proceso en sí, o por errores aleatorios (Himmemblau, 1969).

Así mismo los modelos de crecimiento microbiano se pueden dividir en Segregados y Distribuidos, en tanto se considere a la célula, ya sea independiente (segregada) o uniformemente distribuida en el medio ambiente.

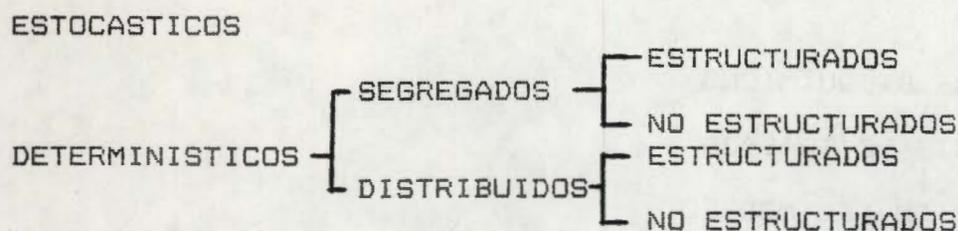


Figura 1. Clasificación de modelos en ciencias naturales.
Adaptado de Himmenblau (1969) y Tsuchiya et al. (1966)

El estado fisiológico de los microorganismos influye el proceso fermentativo, esta idea básica originó el desarrollo de los modelos estructurados y no-estructurados (Tsuchiya, Frederickson y Aris, 1966), de acuerdo a la consideración de los componentes internos de la célula (estructurados) o simplemente considerarla como un ente homogéneo (no estructurados).

Los modelos no-estructurados, desarrollados primero cronológicamente, consideran únicamente cambios en la biomasa, sustrato y producto sin considerar cambios químicos, volúmetricos o geométricos en las células, es decir no toman en cuenta, el estado fisiológico de las células. En este caso la biofase es vista como un medio continuo, como si se tratara de un compuesto químico en solución. La validez del medio continuo en ingeniería, requiere de la existencia de un gran número de células en un volumen relativamente pequeño comparado con el volumen total del sistema (Bailey, 1977; Takamatsu et al, 1981; Holmberg y Ranta, 1979).

Los modelos estructurados, adoptando la terminología de Tsuchiya, et. al. (1966), consideran el estado fisiológico de la células. Es decir tratan de determinar las relaciones de la biomasa, sustrato y producto, con otras propiedades biológicas de los microorganismos, como composición química interna de la célula, distribución de edades y tiempos de duplicación.

Los modelos no estructurados son usados generalmente para diseño de fermentadores, mientras que los estructurados se emplean para estudios fisiológicos más finos. Sin embargo, en la actualidad, dado el desarrollo de los modelos y de la fisiología microbiana, no es posible establecer una división radical entre estos dos tipos de modelos.

2. Metodología de desarrollo de modelos

Previo al desarrollo del modelo debe existir un trabajo conceptual, concluyendo en el establecimiento de postulados o hipótesis de regulación y control del desarrollo de la

fermentación (Fig. 2).

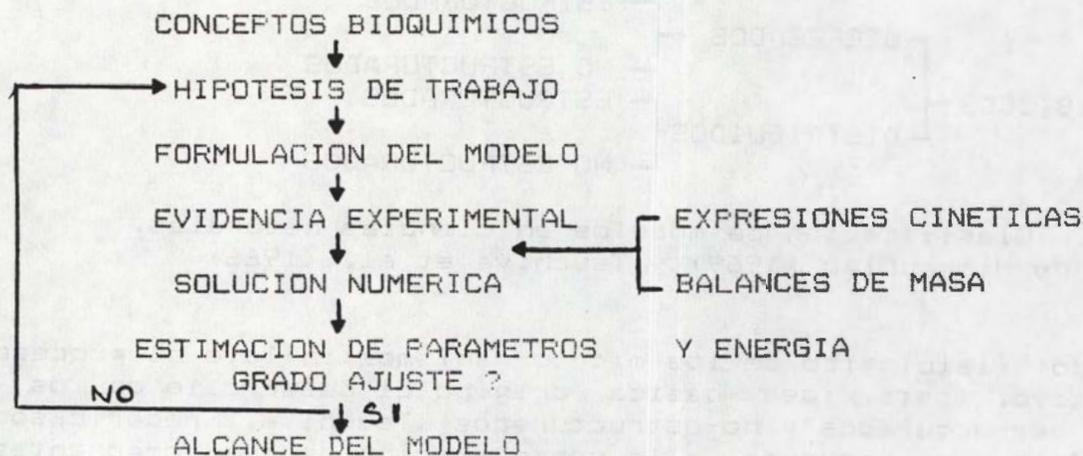


Figura 2. Metodología del desarrollo de modelos en bioingeniería

Con estas premisas es posible formular un modelo que esté integrado por expresiones cinéticas generales de reacción del material biológico.

Posteriormente se pueden establecer balances de masa y energía en los sistemas apropiados, para las variables involucradas, definiendo sus condiciones iniciales y de frontera.

En este momento es importante evaluar las dificultades prácticas para observar las variables del modelo, consideración que si es dejada al margen, puede dar lugar a modelos difíciles de corroborar.

El modelo se comprueba a través de la comparación de datos calculados y experimentales, por medio de la modificación de los parámetros involucrados, la validez del modelo está relacionada al grado de ajuste con la evidencia experimental y a valores adecuados de la constantes involucradas. Esta parte de la metodología es iterativa, y siempre existe la posibilidad de modificar el modelo y repetir la evaluación, finalmente al terminar la evaluación se analiza el alcance y limitaciones del modelo desarrollado.

Es importante que durante el desarrollo del modelo exista una interacción constante entre la parte experimental y la parte matemática.

3. Estimación de parámetros

La comprobación de modelos deben pasar por una etapa muy importante que es la estimación de parámetros, y por esta razón en esta sección se subrayan los puntos sobresalientes.

Los modelos cinéticos aquí presentados incluyen ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) con condiciones iniciales, matemáticamente esto se conocen como problema de valor inicial (PVI). En ocasiones dada la complejidad de las EDO, no siempre es posible encontrar una solución analítica, por lo que frecuentemente se recurre a computadoras digitales para resolver el problema numéricamente.

La comprobación del modelo implica la integración y la comparación de los valores calculados y experimentales. La forma de la solución depende del valor de los parámetros, esto es un problema serio, ya que los parámetros en sistemas biológicos no permanecen constantes por períodos largos de tiempo, además que las expresiones pueden ser no lineales (Holmberg y Ranta, 1979).

Un criterio que generalmente se acepta para estimar los parámetros, es minimizar la suma de cuadrados:

$$\text{MIN } J = \sum (Z_i - \hat{Z}_i)^2$$

esto se puede realizar a través del método del gradiente (steepest descendt) y de Gauss-Newton, desarrollado en el algoritmo de Marquardt (1963), este método es muy poderoso y garantiza convergencia y unicidad en la solución, bajo el criterio de estimación, aunque depende mucho de los valores iniciales de los parámetros.

Otras técnicas de estimación de parámetros, consiste en métodos de búsqueda directa (Rosenbrock), o por linealización de la expresiones cinéticas, ya sea en forma diferencial o integral (Lineweaver-Burk; Eadie-Hofstee; Hanson y Tsao, 1972).

AFENDICE II

MEDIOS DE CULTIVO

Y

TECNICAS ANALITICAS

APENDICE I I
MEDIOS DE CULTIVO Y TECNICAS ANALITICAS

CONTENIDO

1. MEDIO DE ROGOSA MODIFICADO	120
2. MEDIO DE CONSERVACION DE HONGOS	120
3. MEDIO DE ESPORULACION DE HONGOS	120
4. TINCION DE GRAM	121
5. DETERMINACION DE PESO SECO	121
6. ACIDEZ TOTAL TITULABLE Y PH	121
7. DETERMINACION COLORIMETRICA DE ACIDO LACTICO	122
8. DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES	123
9. DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES	123
10. DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS	124
11. DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA	124
12. CROMATOGRAFIA DE GASES (Ac lactico, etanol y AGV's) ...	125

1. MEDIO DE ROGOSA MODIFICADO (Sharpe, 1981)

Componente	g/l
Peptona	10.00
Ext. levadura	5.00
Dextrosa	10.00
Sacarosa	5.00
Acetato de sodio	15.00
Citrato de amonio	2.00
Fosfato monopotásico	6.00
Sulfato de magnesio	0.60
Sulfato de manganeso	0.10
Sulfato ferroso	0.03

Se ajusta el pH a 5.5 con ácido acético glacial

2. MEDIO DE CONSERVACION DE HONGOS (Huerta S., 1984)

Componente	g/l
Harina de yuca tamizada	20
Sulfato de amonio	3
Fosfato monopotásico	1.0
Urea	1.0
Agar	15.0

Procedimiento:

La mezcla se hierve durante 10 minutos, excepto el agar, se deja enfriar y se ajusta el pH a 5 - 5.5 con ácido fosfórico.

Se calienta suavemente y se adiciona el agar.

Se esteriliza a 1 kg/cm² durante 30 minutos.

Una vez frío el medio se inocula con esporas por azada, y se incuba por 5 días a 35 °C.

3. MEDIO DE ESPORULACION (Huerta S. 1984):

Componente	g o ml
Harina de yuca tamizada	100
Sulfato de amonio	8
Urea	2
Fosfato monopotásico	4
Agua	230

Procedimiento:

Las sales se disuelven en el agua y se añade la harina de yuca lentamente, procurando formar una suspensión.

La pasta se distribuye en porciones de aproximadamente 20 g en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con un tapón de gasa y algodón.

El medio se esteriliza en autoclave, durante 30 minutos a 1 kg/cm².

Una vez frío el medio se inocula por azada con esporas de *A. niger* en condiciones de esterilidad, el medio se incuba durante 7 días a 35 °C.

Una vez crecido el micelio y esporulado se adicionan al matraz 150 ml de agua y 0.5 ml de Tween 80 previamente esterilizados.

Se resuspenden las esporas con un agitador magnético durante 15 minutos, posteriormente se filtra con gasa.

Se hace una dilución 1:20 con agua destilada y con esta dilución se llena la cámara de Neubauer, usando una pipeta Pasteur.

Se cuenta las esporas de 10 cuadros de la cámara dispuestos diagonalmente, observando al microscopio con el objetivo de 40 X. Se obtiene un promedio de las esporas por cuadro y se multiplica por el factor de conversión de la cámara (25 x E04) y por la dilución realizada (20).

Se adicionan la cantidad de esporas suficiente para tener 2 x E07 esporas por gramo de yuca seca.

4. TINCION DE GRAM (Cruickshank et al 1975)

Reactivos:

Disolver 2.0 g de cristal violeta en 20 ml de etanol al 95 %.

Disolver 0.8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua.

Mezclar las soluciones preparadas (solución de cristal violeta).

En un mortero moler finamente 1.0 g de Yodo y 2.0 g de yoduro de potasio (KI)

Disolver la mezcla molida en 300 ml de agua (Lugol).

Mezclar volumétricamente etanol (95 %) y acetona en proporciones 7:1 (Decolorante).

Disolver 0.25 g de Safranina en 10 ml de etanol al 95 %, posteriormente aforar a 100 ml con agua destilada. Filtrar la solución.

Procedimiento:

Hacer el frotis del cultivo, en un portaobjetos, posteriormente secar al aire y fijar a la flama.

Agregar 2 gotas solución de cristal violeta sobre el frotis, lavar con agua de después de 1 minuto.

Agregar 2 gotas de lugol, lavar con agua después de 1 minuto.

Decolorar gota a gota con la solución de alcohol-acetona, hasta que ya no arrastre colorante.

Agregar 2 gotas de Safranina, lavar después de 10-20 segundos.

Secar al aire y observar al microscopio a 40 o 100 X con aceite de inmersión.

5. DETERMINACION DE PESO SECO (AOAC, 1980)

Procedimiento:

Pesar con balanza analítica alrededor de 10 g de muestra húmeda, en charolas de acero inoxidable, previamente taradas.

Mantener en estufa a 105 °C durante 24 horas.

Sacar de la estufa, dejar enfriar en desecador, y pesar.

Los resultados se expresan como % de humedad o de materia seca.

6. ACIDEZ TOTAL TITULABLE Y pH (AOAC, 1980)

Reactivos:

Solución valorada de NaOH aproximadamente 0.1 N

Soluciones patrón pH 4 y 7

Procedimiento:

Hacer una calibración doble del potenciómetro a pH 4 y 7
 Pesar en balanza analítica alrededor de 5 g de muestra húmeda de silo
 Agregar 45 ml de agua destilada
 Agitar durante 5 minutos
 Medir el pH sobre el sobrenadante
 Agitar con una barra magnética, mientras gota a gota se titula con la sosa, hasta llegar a pH 7
 El resultado se expresa como g ácido láctico/kg MS:

$$g \text{ ac. láctico/kg MS} = N \times V \times 90 / (P_{mh} \times F_s)$$

N : Normalidad de sosa

V : Volumen gastado (ml)

P_{mh} : Peso de la muestra húmeda (g)

F_s : Fracción de materia seca de la muestra

7. DETERMINACION COLORIMETRICA DE ACIDO LACTICO (Barker y

Summerson, 1941 y Barnett 1951)

Reactivos:

Solución 1.5 % de p-Hidroxidifenil en NaOH 0.5 %

Solución al 4 % de CuSO₄:5H₂O

Solución al 20 % de CuSO₄:5H₂O

Hidróxido de calcio en polvo

e) Acido sulfúrico concentrado

Solución patrón de ácido láctico (88 % pureza, p.e. = 1.249 15/4), obtenida mediante la dilución 1:50, de una solución de 1 ml/l.

Procedimiento:

Tomar 5 gr de muestra húmeda (20 g ac. láctico/kg), resuspenderla en 45 ml de agua destilada, agitar vigorosamente durante 5 minutos con una barra magnética (aprox. 2000 microgramos/ml).

Del sobrenadante hacer una dilución 1:20 (0.5 ml del sobrenadante + 9.5 ml agua, aprox 100 microgramos/ml).

Preparar la curva patrón de ácido láctico agregando de 0 a 5 ml de la dilución 1:50 de ácido láctico, y ajustando el volumen final a 5 ml.

A 1 ml de muestra y a la curva patrón, agregar 1 ml de sulfato de cobre 20 %

Agregar 8 ml de agua a las muestras y 4 a la curva patrón.

Adicionar aproximadamente 1 g de Ca(OH)₂, agitar vigorosamente inmediatamente después (10 microgramos/ml).

Dejar reposar la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar durante 7 minutos a 4000 rpm

Transferir 1 ml del sobrenadante (10 microgramos/ml) y adicionar 0.05 ml de sulfato de cobre al 4%, enfriar los tubos en baño de hielo, y adicionar 6 ml de H₂SO₄, previamente enfriado, agitar cuidadosamente.

Llevar a un baño de agua en ebullición durante 5 minutos.

Enfriar en baño de hielo.

Adicionar 0.1 ml del reactivo de p-Hidroxidifenil, agitar vigorosamente inmediatamente después.

Incubar a 33 °C durante 30 minutos.

Durante la incubación agitar dos veces

Llevar a un baño de agua en ebullición durante 2 minutos.

Leer densidad óptica a 560 nm.

8. DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES (Miller, 1959)

Reactivos:

Disolver 1 g de ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS), 1 g de NaOH, 0.05 g de sulfito de sodio anhidro, 0.20 g fenol, en agua destilada, posteriormente aforar a 100 ml de solución (Reactivo de DNS).

Solución patrón de glucosa de 0 a 1 g/l.

Procedimiento:

Del sobrenadante del macerado (3.1.8) tomar 0.5 ml, agregar 0.5 ml de agua.

Adicionar 1 ml del reactivo DNS

Agitar en vortex, llevar a un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, enfriar posteriormente en un baño de agua.

Agregar 8 ml de agua destilada, agitar

Leer absorbancia de 0.1 a 0.60 a 575 nm.

Los resultados se expresan en g glucosa/kg MS:

$$g \text{ glucosa/kg MS} = (Abs - b) \times 20 / (Pm \times m)$$

Abs : Densidad óptica de la muestra

b : Ordenada al origen de la curva patrón

m : Pendiente de la curva patrón

Pm : Peso de la muestra seca

9. DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES (Yusaku et al., 1985)

Reactivos

a) HCl 1 N

b) NaOH 1 N

b) Reactivo de DNS

Procedimiento:

Tomar 1 ml del macerado (3.1.8) y agregar 5 ml de HCl 1 N.

Llevar a un baño en ebullición durante 3 horas.

Agregar 5 ml de NaOH 1 N

Aforar a 100 ml

Tomar 1 ml y agregar 1 ml de reactivo de DNS.

Seguir la técnica de azúcares reductores (8)

Los resultados de expresan como % de azúcares reductores totales en la muestra:

$$\% \text{ azúcares reductores totales} = (Abs - b) \times 100 / (Pm \times m)$$

Abs : Densidad óptica de la muestra

b : Ordenada al origen de la curva patrón

m : Pendiente de la curva patrón

Pm : Peso de la muestra seca

10. DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS (Gómez y Viniegra, 1977)

Reactivos:

Solución de ácido perclórico 0.7 M

Solución patrón 20 mg/l de ácido ribonucleico (RNA) de levadura de *Torula* T-VI, Sigma Chem. Co., en ácido perclórico 0.7 M.

Procedimiento:

Tomar 2 ml de la suspensión del macerado de la muestra (3.1.8)

Agregar 5 ml de agua destilada, agitar

Centrifugar durante 15 minutos a 4 000 rpm

Tirar el sobrenadante

Agregar 5 ml de la solución de ácido perclórico

Agitar en vortex hasta resuspender el sedimento

Incubar a 70 °C durante 20 minutos

Agitar una vez durante la incubación.

Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos

Lavar las celdas de cuarzo del espectrofotómetro con una solución de HCl en etanol al 30 %.

Se calibra el aparato con aire y sin celdas a 270 nm.

Se lee la absorbancia, con las celdas vacías

Para que las lecturas con las celdas sean válidas el % de trasmittancia debe ser > a 80.

Leer absorbancia de las muestras a 260 nm entre 0.1 y 0.6. Hacer diluciones con ácido perclórico si es necesario.

Para asegurar que no hay interferencia con proteínas la relación de densidad óptica a 260 y 280 nm debe ser mayor a 2.

Los resultados se expresan como mg equivalentes de RNA de levadura/kg MS:

$$\text{mg RNA/kg MS} = (\text{Abs} - b) \times 25\,000 / (\text{Pm} \times m)$$

Abs : Densidad óptica de la muestra

b : Ordenada al origen de la curva patrón

m : Pendiente de la curva patrón

Pm : Peso de la muestra seca

11. DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA (Lowry y col, 1951)

Reactivos:

Disolver 20 g de Na₂CO₃ en 1 l de NaOH 0.1 N

Disolver 1 g de CuSO₄ en 100 ml de agua

Disolver 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua

Reactivo de Folin Ciocalteu, diluir 1:2 al momento de usarlo

Solución patrón de Seroalbumina bovina, de 0 a 330 mg/l

Procedimiento:

De la suspensión del macerado (3.1.8), hacer una dilución 1:5 si se trata de emsilaje, y una dilución 1:50 si se trata de enriquecimiento protéico (3.2.6)

Tomar 1 ml de dilución, agregar 1 ml de NaOH 1 N

Llevar a un baño en ebullición durante 5 minutos

Enfriar los tubos en baño de hielo

Preparar: 50 ml de la solución de a) + 1 ml de b) + 1 ml de c)
 Adicionar 5 ml de la mezcla anterior a cada muestra, agitar
 Dejar reposar en la oscuridad durante 30 minutos
 Agregar 1 ml de la solución de Folin, guardar en la oscuridad durante 30 minutos
 Leer absorbancia a 750 nm, con filtro rojo
 Los resultados se expresan como g de proteína verdadera/kg MS:

$$g \text{ proteína/kg MS} = (\text{Abs} - b) \times 5 / (\text{Pm} \times m)$$

Abs : Densidad óptica de la muestra
 b : Ordenada al origen de la curva patrón
 m : Pendiente de la curva patrón
 Pm : Peso de la muestra seca

12. CROMATOGRAFIA DE GASES

Determinación de ácido láctico, etanol, ácido acético, propiónico y butírico por cromatografía de gases (Gómez y Coronado, 1983)

Aparato:

El cromatógrafo empleado fue marca Varian 1440, con detector de ionización de flama, usando nitrógeno como gas acarreador, hidrógeno y aire para la flama del quemador. El aparato contó con un registrador gráfico y un integrador marca Varian modelo CDS 111. Con un puerto de inyección directamente sobre la columna.

Preparación de columnas:

Se emplearon indistintamente dos columnas, en cada una de ellas se caracterizó el tiempo de retención de los diferentes compuestos.

a) La primera columna es de 1.6 m de largo de tubo de acero inoxidable de 1/8 de pulgada; esta columna se rellena con 78% de Chromosorb W, malla 80-100, 20 % de Tween 80, y 2 % de ácido fosfórico.

b) La segunda columna tienen las mismas características que la anterior excepto que es de 1.20 m de largo y se empaca con Porapak QS.

Flujo de gases:

Se trabajó con el siguiente flujo de gases para cualquiera de las dos columnas:

a) Hidrógeno. Se requiere un flujo de 30 ml/min, medido directamente sobre el quemador.

b) Aire. El flujo de 200 ml/min se mide colocando un quemador accesorio, en la cámara del detector del cromatógrafo

b) Nitrógeno. El flujo se mide directamente sobre la columna, siendo de 20-40 ml/min.

Calibración del cromatógrafo:

Con los flujos de gases medidos adecuadamente, y calentado el aparato durante al menos 3 horas, se calibra el aparato siguiendo

el procedimiento del manual del equipo.

Condiciones de operación del cromatógrafo:

Para ácido láctico y ácidos grasos volátiles (AGVS), las condiciones de cada columna son:

	Columna	
	A	B
Temp inicial columna (°C)	90	200
Temp final columna (°C)	130	200
Vel. de calentamiento (°C/min)	15	0
Temp. inyector (°C)	110	220
Temp. detector (°C)	110	240
Tiempo de retención (min)	3-4	8

Para el caso de la columna con Porapak QS (b), la columna se mantiene isotérmica, y es necesario emplear septos que resistan altas temperaturas.

Preparación de soluciones patrón para láctico, AGV[^]s y etanol:

Se prepara una solución patrón de 15 ml/l de ácido láctico, y se le da el mismo tratamiento que a las muestras problema.

Se prepara una solución de 1 ml/l de etanol y AGV[^]s. Posteriormente en los cálculos se toma en cuenta la pureza y densidad de los reactivos, para conocer las concentraciones en g/l de cada compuesto.

Preparación de la muestra:

Se toman 5 ml del sobrenadante de la muestra que se usó para determinar pH y ATT, (3.4), centrifugar a 5000 rpm 10 min, agregar 0.5 ml de una mezcla de ácido fosfórico y ácido fórmico (25%) en una relación en volumen de 3:1.

Para determinar etanol y AGV[^]s se inyecta, directamente del sobrenadante de la muestra centrifugada, en cualquiera de las dos columnas.

Para determinar ácido láctico se procede como sigue:

Del sobrenadante de las muestras ya preparadas (centrifugadas) se toma 1 ml, se le agrega 0.6 ml de ácido sulfúrico (50 % v:v) y 3 ml de metanol, se mezcla, y se incuba durante 1 hora a 55 °C. Se deja enfriar y se agrega 1 ml de agua destilada, se agita, y se agrega un ml de cloroformo que solubiliza el ácido láctico metilado.

Análisis de la muestra:

Se estabiliza el aparato inyectando al menos tres veces soluciones patrón con que se va a trabajar. Además durante el análisis de las muestras, estas se intercalan con soluciones patrón, en una relación de 5:1.

Se puede analizar AGV[^]s y etanol indistintamente en las dos columnas. El ácido láctico metilado se determina únicamente

en la primera columna descrita columna (a).

Finalmente, se inyectan 3 μ l con una microjeringa Hamilton, directamente en la columna a través de un septo de plástico que tiene una vida media de 15-20 inyecciones.

Se comparan linealmente, los resultados de las soluciones patrón de concentración conocida y los de las muestras, a través de la integración de los picos mediante el CDS 111, o midiendo el área bajo cada pico directamente en el graficador.

APENDICE III**PROGRAMAS DEL MODELAMIENTO DE
ENRIQUECIMIENTO PROTEICO**

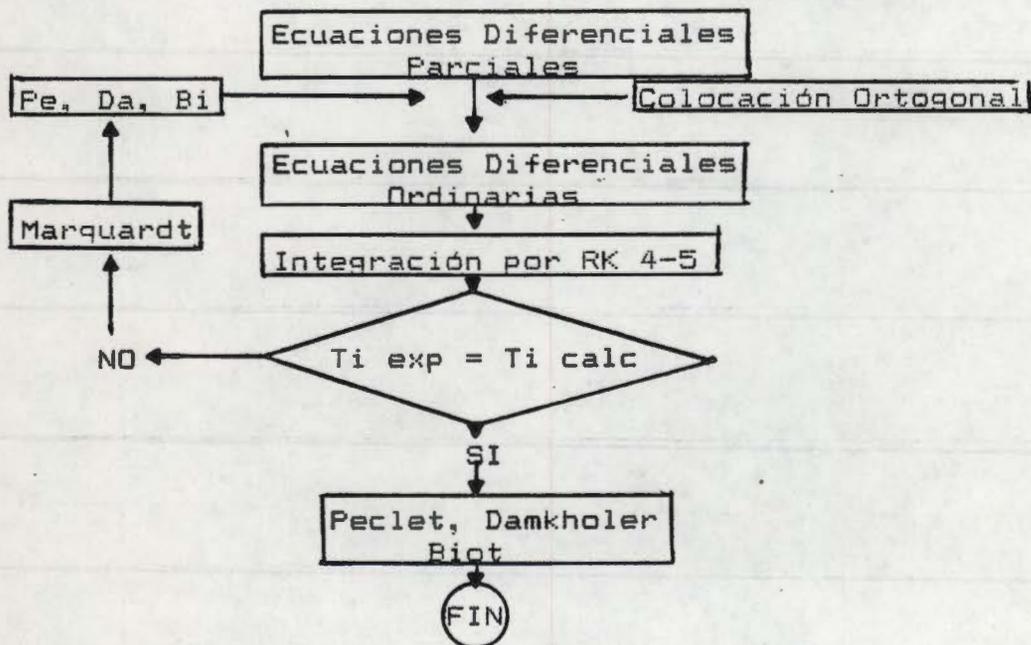
APENDICE III

PROGRAMAS DEL MODELAMIENTO DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO

CONTENIDO

1. ESQUEMA DE CALCULO PARA LA ESTIMACION DE PARAMETROS	129
2. PROGRAMA DE SIMULACION Y ESTIMACION DE PARAMETROS DEL BIOREACTOR DE ENRIQUECIMIENTO PROTEICO	130
3. DATOS DE CORRIDA COND5	147
4. DATOS DE CORRIDA COND19	149
5. PROGRAMA DE ESTIMACION DE PARAMETROS DE u MAXIMA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA	151
6. DATOS EXPERIMENTALES DE u MAXIMA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA	159

1. ESQUEMA DE CALCULO PARA LA ESTIMACION DE PARAMETROS



APR 13, 1987, 12:02 PM

130

ER: JSC

XT FILE NAME: BITSE.LACTICO.D0904A01

EP FILE NAME: BITSE.LACTICO.D0904A01

LE NUMBERED

CORD LENGTH: 80 BYTES

MBER OF RECORDS: 904

LE CODE: 0

RSIONS: 1

2. PROGRAMA DE SIMULACION Y ESTIMACION DE PARAMETROS DEL
BIOREACTOR DE ENRIQUECIMIENTO

SCONTROL USLINIT,NOLIST,LOCATION,INIT

C PROGRAMA PARA ESTIMAR LOS VALORES DE LOS PARAMETROS
 C DE BIOT, PECKET Y DAMKHOLER EN UN REACTOR DE
 C FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO
 C CON CINETICA DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA
 C A TRAVES DE K(T) MAX FORMACION BIOMASA
 C Y MU(T) O MU=CTE OPCIONAL

DIMENSION TH(6),SIGNS(6),DIFF(6),SCRAT(600)
 EXTERNAL MODEL
 EXTERNAL FSUB
 DIMENSION TEMP(64)

DIMENSION Y(14),WORK(90),IWORK(5),CTE(20),AR(3,3),BR(3,3),XR(3)
 COMMON/A/AR,BR,CTE

READ(5,*)(CTE(I),I=1,9)

READ(5,*)(CTE(I),I=10,14)

READ(5,*)(CTE(I),I=15,18)

READ(5,*)(CTE(I),I=19,20)

READ(5,*)(XR(I),I=1,3)

READ(5,*)(AR(1,I),I=1,3)

READ(5,*)(AR(2,I),I=1,3)

READ(5,*)(AR(3,I),I=1,3)

READ(5,*)(BR(1,I),I=1,3)

READ(5,*)(BR(2,I),I=1,3)

READ(5,*)(BR(3,I),I=1,3)

READ(5,*)(TEMP(I),I=1,8)

READ(5,*)(TEMP(I),I=9,16)

READ(5,*)(TEMP(I),I=17,24)

READ(5,*)(TEMP(I),I=25,32)

READ(5,*)(TEMP(I),I=33,40)

READ(5,*)(TEMP(I),I=41,48)

READ(5,*)(TEMP(I),I=49,56)

READ(5,*)(TEMP(I),I=57,64)

READ(5,*)NOB,NP,NPROB

READ(5,*)(TH(I),I=1,NP)

DO 4 I=1,NP

DIFF(I)=.01

4 SIGNS(I)=1.

EPS1=1.E-05

EPS2=1.E-05

IT=999

XLAM=0.01

CALL UWHAUS(NPROB,MODEL,NOB,TEMP,NP,TH,DIFF,SIGNS,EPS1,
 1EPS2,IT,XLAM,10.,SCRAT)

STOP

END

SUBROUTINE UWHAUS(NPROB,MODEL,NOB,Y,NP,TH,DIFF,SIGNS,
 1 EPS1,EPS2,MIT,FLAM,FNU,SCRAT)

DIMENSION SCRAT(1),Y(1),TH(1),DIFF(1),SIGNS(1)

EXTERNAL MODEL

IA=1

IB=IA+NP

IC=IB+NP

ID=IC+NP

IE=ID+NP

IF=IE+NP

IG=IF+NOB

IH=IG+NOB

II = IH + NP * NOB

IJ = IH

CALL HAUS59(NPROB,MODEL,NOB,Y,NP,TH,DIFF,SIGNS,EPS1,EPS2,MIT

```

1      1 ,FLAM,FNU,SCRAT(IA), SCRAT132(IB), SCRAT(IC), SCRAT(ID),
2      2 SCRAT(IE), SCRAT(IF), SCRAT(IG), SCRAT(IH), SCRAT(II),
3      3 SCRAT(IJ) )
4      RETURN
5      END
6      SUBROUTINE HAUS59(NPROBO, MODEL, NOB, Y,NQ,TH,DIFZ,SIGNS,EP1S,EP2S
7      1,MIT,FLAM,FNU, Q,P,E,PHI,TB,F,R,A,D,DELZ)
8      C          FORTRAN II VERSION
9      C          H. J. WERTZ
0      C          ADAPTED FOR THE CDC 6400 (J. F.MACGREGOR)
1      C
2      C          DIMENSION TH(NQ), DIFZ(NQ), SIGNS(NQ), Y(NBO)
3      C          DIMENSION Q(NQ), P(NQ), E(NQ), PHI(NQ), TB(NQ)
4      C          DIMENSION F(NBO), R(NBO)
5      C          DIMENSION A(NQ,NQ), D(NQ,NQ), DELZ(NBO,NQ)
6      C          DIMENSION TH(1), DIFZ(1), SIGNS(1), Y(1), Q(1), P(1), E(1),
7      1 PHI(1), TB(1), F(1), R(1), A(1), D(1), DELZ(1)
8      C          DIMENSION DUM1(10),DUM2(100),DUM3(10)
9      C          EXTERNAL MODEL
0      C          ARCOS(X) = ATAN(SQRT(1.0/X**2 - 1.0))
1      C          NP = NQ
2      C          NPROB = NPROBO
3      C          NOB = NBO
4      C          EPS1 = EP1S
5      C          EPS2 = EP2S
6      C          NPSQ = NP * NP
7      C          NSCRAC = 5*NP+NPSQ +2*NOB+NP*NOB
8      C          WRITE(6,1000) NPROB, NOB, NP, NSCRAC
9      C          WRITE(6,1001)
0      C          CALL GASS60(1,NP,TH,DUM1,DUM2)
1      C          WRITE(6,1002)
2      C          CALL GASS60(1,NP,DIFZ,DUM1,DUM2)
3      C          IF(MIN0(NP-1,50-NP,NOB-NP,MIT-1,999-MIT))99,15,15
4      15 IF(FNU-1.0)99, 99, 16
5      16 CONTINUE
6      C          DO 19 I=1,NP
7      C          TEMP = ABS(DIFZ(I))
8      C          IF(AMIN1(1.0-TEMP, ABS(TH(I))))99, 99, 19
9      19 CONTINUE
0      C          GA = FLAM
1      C          NIT = 1
2      C          LAOS=0
3      C          IF(EPS1) 5,70,70
4      5 EPS1 = 0
5      70 SSG = 0
6      C          CALL MODEL(NPROB, TH, F, NOB, NP)
7      C          DO 90 I = 1, NOB
8      C          R(I) = Y(I) - F(I)
9      90 SSG=SSG+R(I)*R(I)
0      C          WRITE(6,1003) SSG
1      C
2      C          BEGIN ITERATION
3      C
4      100 GA = GA / FNU
5      C          INTCNT = 0
6      C          WRITE(6,1004) NIT
7      101 JS = 1 - NOB
8      C          DO 130 J=1,NP
9      C          TEMP = TH(J)
0      C          P(J)=DIFZ(J)*TH(J)
1      C          TH(J)= TH(J)+P(J)

```

Q(J)=0
JS = JS + NOB
CALL MODEL(NPROB, TH, DELZ(JS), NOB, NP)

133

IJ = JS-1
DO 120 I = 1, NOB
IJ = IJ + 1
DELZ(IJ) = DELZ(IJ) - F(I)

120 Q(J) = Q(J) + DELZ(IJ) * R(I)
Q(J) = Q(J)/P(J)

C Q=XT*R (STEEPEST DESCENT)

130 TH(J) = TEMP
IF(LAOS) 131,131,414

131 DO 150 I = 1, NP
DO 151 J=1,I
SUM = 0

KJ = NOB*(J-1)
KI = NOB*(I-1)
DO 160 K = 1, NOB
KI = KI + 1
KJ = KJ + 1

160 SUM = SUM + DELZ(KI) * DELZ(KJ)
TEMP = SUM/(P(I)*P(J))
JI = J + NP*(I-1)

D(JI) = TEMP
IJ = I + NP*(J-1)

151 D(IJ) = TEMP
150 E(I) = SQRT(D(JI))

666 CONTINUE
DO 153 I = 1, NP
IJ = I-NP
DO 153 J=1,I
IJ = IJ + NP
A(IJ) = D(IJ) / (E(I)*E(J))
JI = J + NP*(I-1)

153 A(JI) = A(IJ)

C A = SCALED MOMENT MATRIX

II = - NP
DO 155 I=1,NP
P(I)=Q(I)/E(I)

PHI(I)=P(I)
II = NP + 1 + II

155 A(II) = A(II) + GA

C

I=1
CALL MATIN(A, NP, P, I, DET)

C P/E = CORRECTION VECTOR

STEP=1.0
SUM1=0.
SUM2=0.
SUM3=0.
DO 231 I=1,NP
SUM1=P(I)*PHI(I)+SUM1
SUM2=P(I)*P(I)+SUM2
SUM3=PHI(I) * PHI(I) + SUM3
231 PHI(I) = P(I)

TEMP = SUM1/SQRT(SUM2*SUM3)
TEMP = AMIN1(TEMP, 1.0)
TEMP = 57.295*ARCOS(TEMP)
WRITE(6,1041) DET, TEMP

170 DO 220 I = 1, NP

P(I) = PHI(I) *STEP / E(I)

TB(I) = TH(I) + P(I)

220 CONTINUE

WRITE(6,7000)

7000 FORMAT(30H0TEST POINT PARAMETER VALUES)

WRITE(6,2006) (TB(I), I = 1, NP)

DO 221 I = 1, NP

IF(SIGNS(I)) 221, 221, 222

222 IF(SIGN(1.0,TH(I))*SIGN(1.0,TB(I))) 663, 221, 221

221 CONTINUE

SUMB=0

CALL MODEL(NPROB, TB, F, NOB, NP)

DO 230 I=1,NOB

R(I)=Y(I)-F(I)

230 SUMB=SUMB+R(I)*R(I)

WRITE(6,1043) SUMB

IF(SUMB - (1.0+EPS1)*SSQ) 662, 662, 663

663 IF(AMIN1(TEMP-30.0, GA)) 665, 665, 664

665 STEP=STEP/2.0

INTCNT = INTCNT + 1

IF(INTCNT - 36) 170, 2700, 2700

664 GA=GA*FNU

INTCNT = INTCNT + 1

IF(INTCNT - 36) 666, 2700, 2700

662 WRITE(6,1007)

DO 669 I=1,NP

669 TH(I)=TB(I)

CALL GASS60(1,NP,TH,DUM1,DUM2)

WRITE(6,1040) GA, SUMB

IF(EPS2) 229,229,225

229 IF(EPS1) 270,270,265

225 DO 240 I = 1, NP

IF(ABS(P(I))/(1.E-20+ABS(TH(I)))-EPS2) 240, 240, 241

241 IF(EPS1) 270,270,265

240 CONTINUE

WRITE(6,1009) EPS2

GO TO 280

265 IF(ABS(SUMB - SSQ) - EPS1*SSQ) 266, 266, 270

266 WRITE(6,1010) EPS1

GO TO 280

270 SSQ=SUMB

NIT=NIT+1

IF(NIT - MIT) 100, 100, 280

2700 WRITE(6,2710)

2710 FORMAT(/115H0**** THE SUM OF SQUARES CANNOT BE REDUCED TO THE SUM
10F SQUARES AT THE END OF THE LAST ITERATION - ITERATING STOPS /)

C

C

END ITERATION

C

280 WRITE(6,1011)

WRITE(6,2001) (F(I), I = 1, NOB)

WRITE(6,1012)

WRITE(6,2001) (R(I), I = 1, NOB)

SSQ=SUMB

IDF=NOB-NP

WRITE(6,1015)

I=0

CALL MATIN(D, NP, P, I, DET)

DO 7692 I=1,NP

II = I + NP*(I-1)

7692 E(I) = SQRT(D(II)) 135

DO 340 I=1, NP
JI = I + NP*(I-1) - 1
IJ = I + NP*(I-2)
DO 340 J = I, NP
JI = JI + 1
A(JI) = D(JI) / (E(I)*E(J))

340 A(IJ) = A(JI)
CALL GASS60(3, NP, DUM3, DUM1, A)
WRITE(6, 1016)

CALL GASS60(1, NP, E, DUM1, DUM2)
IF(IDF) 341, 410, 341

341 SDEV = SSQ / IDF
WRITE(6, 1014) SDEV, IDF

SDEV = SQRT(SDEV)
DO 391 I=1, NP
P(I) = TH(I) + 2.0 * E(I) * SDEV
391 TB(I) = TH(I) - 2.0 * E(I) * SDEV

WRITE(6, 1039)
CALL GASS60(2, NP, TB, P, DUM2)
LAOS=1
GO TO 101

414 DO 415 K = 1, NOB
TEMP = 0
DO 420 I=1, NP
DO 420 J=1, NP

ISUB = K + NOB*(I-1)
DEBUG1 = DELZ(ISUB)
C DEBUG1 = DELZ(K + NOB*(I-1))
ISUB = K + NOB*(J-1)

DEBUG2 = DELZ(ISUB)
C DEBUG2 = DELZ(K + NOB*(J-1))
IJ = I + NP*(J-1)
DEBUG3 = D(IJ) / (DIFZ(I) * TH(I) * DIFZ(J) * TH(J))

420 TEMP = TEMP + DEBUG1 * DEBUG2 * DEBUG3
TEMP = 2.0 * SQRT(TEMP) * SDEV
R(K) = F(K) + TEMP

415 F(K) = F(K) - TEMP
WRITE(6, 1008)

IE=0
DO 425 I=1, NOB, 10
IE=IE+10
IF(NOB-IE) 430, 435, 435

430 IE=NOB
435 WRITE(6, 2001) (R(J), J=I, IE)
425 WRITE(6, 2006) (F(J), J=I, IE)

410 WRITE(6, 1033) NPROB
RETURN

99 WRITE(6, 1034)
GO TO 410

1000 FORMAT(38HINON-LINEAR ESTIMATION, PROBLEM NUMBER I3, // I5,
1 14H OBSERVATIONS, I5, 11H PARAMETERS I14, 17H SCRATCH REQUIRED)

1001 FORMAT(/25H0INITIAL PARAMETER VALUES)

1002 FORMAT(/54H0PROPORTIONS USED IN CALCULATING DIFFERENCE QUOTIENTS)

1003 FORMAT(/25H0INITIAL SUM OF SQUARES = E12.4)

1004 FORMAT(/////45X, 13HITERATION NO. I4)

1007 FORMAT(/32H0PARAMETER VALUES VIA REGRESSION)

1008 FORMAT(/////54H0APPROXIMATE CONFIDENCE LIMITS FOR EACH FUNCTION VAL

1UE)

```

1 1009 FORMAT(/62H0ITERATION STOPS - RELATIVE CHANGE IN EACH PARAMETER LE
2 1SS THAN E12.4)
3 1010 FORMAT(/62H0ITERATION STOPS - RELATIVE CHANGE IN SUM OF SQUARES LE
4 1SS THAN ,E12.4/)
5 1011 FORMAT(/22H1FINAL FUNCTION VALUES )
6 1012 FORMAT(////10H0RESIDUALS )
7 1014 FORMAT(/24H0VARIANCE OF RESIDUALS = ,E12.4,1H,I4,
8 120H DEGREES OF FDEEDOM )
9 1015 FORMAT(////19H0CORRELATION MATRIX )
0 1016 FORMAT(////21H0NORMALIZING ELEMENTS )
1 1033 FORMAT(/19H0END OF PROBLEM NO. I3)
2 1034 FORMAT(/16H0PARAMETER ERROR )
3 1039 FORMAT(/71H0INDIVIDUAL CONFIDENCE LIMITS FOR EACH PARAMETER (ON LI
4 1NEAR HYPOTHESIS) )
5 1040 FORMAT(/,1X,'LAMBDA =' ,E10.3,5X,'SUM OF SQUARES AFTER REGRESSION='
6 1E15.7)
7 1041 FORMAT(14H DETERMINANT = E12.4, 6X, 25H ANGLE IN SCALED COORD. =
8 1 F5.2, 8HDEGREES )
9 1043 FORMAT(28H0TEST POINT SUM OF SQUARES = E12.4)
0 2001 FORMAT(/5E12.4)
1 2006 FORMAT(/5E12.4)
2 END
3 SUBROUTINE MATIN(AA, NVAR, BB, NB, DET)
4 DIMENSION A(NVAR,NVAR),B(NVAR,1),AA(1),BB(1)
5 DO 1 I=1,NVAR
6 B(I,1)=BB(I)
7 DO 1 J=1,NVAR
8 1 A(J,I)=AA(J+NVAR*(I-1))
9 PIVOTM = A(1,1)
0 DET = 1.0
1 DO 550 ICOL = 1, NVAR
2 PIVOT = A(ICOL, ICOL)
3 PIVOTM = AMIN1(PIVOT, PIVOTM)
4 DET = PIVOT * DET
5 C
6 C DIVIDE PIVOT ROW BY PIVOT ELEMENT
7 C
8 A(ICOL, ICOL) = 1.0
9 PIVOT = AMAX1(PIVOT, 1.E-20)
0 PIVOT = A(ICOL, ICOL)/PIVOT
1 DO 350 L=1,NVAR
2 350 A(ICOL, L) = A(ICOL,L)*PIVOT
3 IF(NB .EQ. 0) GO TO 371
4 DO 370 L=1,NB
5 370 B(ICOL, L) = B(ICOL, L)*PIVOT
6 C
7 C REDUCE NON-PIVOT ROWS
8 C
9 371 DO 550 L1=1,NVAR
0 IF(L1 .EQ. ICOL) GO TO 550
1 T = A(L1, ICOL)
2 A(L1, ICOL) = 0.
3 DO 450 L=1,NVAR
4 450 A(L1, L) = A(L1, L) - A(ICOL, L)*T
5 IF(NB .EQ. 0) GO TO 550
6 DO 500 L=1,NB
7 500 B(L1, L) = B(L1, L)-B(ICOL,L)*T
8 550 CONTINUE
9 DO 3 I=1,NVAR
0 BB(I)=B(I,1)
1

```

```

DO 3 J=1,NVAR
3 AA(J+NVAR*(I-1))=A(J,I)
RETURN

```

```

END

```

```

SUBROUTINE GASS60(ITYPE,NQ,A,B,D)
DIMENSION A(10),B(10),D(100),C(10,10)

```

```

NP = NQ

```

```

NR = NP/10

```

```

LOW = 1

```

```

LUP = 10

```

```

10 IF( NR )15,20,30

```

```

15 RETURN

```

```

20 LUP=NP

```

```

IF(LOW .GT. LUP) RETURN

```

```

30 WRITE(6,500) (J,J=LOW,LUP)

```

```

GO TO (40,60,80),ITYPE

```

```

40 WRITE(6,600)(A(J),J=LOW,LUP)

```

```

GO TO 100

```

```

60 WRITE(6,600) (B(J),J=LOW,LUP)

```

```

GO TO 40

```

```

80 CONTINUE

```

```

DO 85 I=1,NP

```

```

DO 85 J=1,NP

```

```

85 C(J,I)=D(J+NP*(I-1))

```

```

DO 90 I=LOW,LUP

```

```

90 WRITE(6,720)I,(C(J,I),J=LOW,LUP)

```

```

LOW2=LUP+1

```

```

IF(LOW2 .GT. NP) GO TO 100

```

```

DO 95 I=LOW2,NP

```

```

95 WRITE(6,720)I,(C(J,I),J=LOW,LUP)

```

```

100 LOW = LOW + 10

```

```

LUP = LUP + 10

```

```

NR = NR - 1

```

```

GO TO 10

```

```

500 FORMAT(/I8,9I12)

```

```

600 FORMAT( 5E12.6)

```

```

720 FORMAT(1H0,I3,1X,5F12.4,/5X,5F12.4)

```

```

1 CONTINUE

```

```

RETURN

```

```

END

```

```

C
C
C

```

```

*****

```

```

SUBROUTINE MODEL(NPROB,TH,F,NOB,NP)

```

```

EXTERNAL FSUB

```

```

INTEGER N,NEQN36

```

```

DIMENSION Y(14),WORK(90),IWORK(5),TH(6),F(64),A(2),B(2,2)

```

```

1,AR(3,3),BR(3,3),CTE(20)

```

```

COMMON/A/AR,BR,CTE

```

```

COMMON/B/PM,DA,BI,B,A,CTE2,CTE4,R1,R2,UM,BIOMAX

```

```

COMMON/C/YC,YW

```

```

PM = TH(1)

```

```

DA = TH(2)

```

```

BI = TH(3)

```

```

C CRECIMIENTO MAXIMO DE BIOMASA BIOMAX=CTE(3) O VAR(T)

```

```

VAR=0

```

```

BIOMAX=CTE(3)

```

```

C TASA ESPECIFICA DE CRECIMIENTO MU=CTE(1) O VAR(T)

```

```

UM=CTE(1)

```

```

C FACTOR DE RENDIMIENTO DE BIOMASA G X/ G S

```

```

1      CTE2=CTE(2)
2      C   MANTENIMIENTO
3      CTE4=CTE(4)
4      C   FACTOR DE EQUIVALENCIA DE TIEMPO INTEGRACION Y FERMENTACION
5      R1 = 100.0
6      C   RENDIMIENTO DE G CO2/G S
7      R2 = 0.5110
8      IFLAG = 1
9      ERRABS = 1.E-04
0      ERRREL = 1.E-05
1      C   TIEMPO DE INTEGRACION
2      X = 0.0
3      XFINAL = 3000.
4      C
5      C
6      C
7      C   DICTAR CONDICIONES INICIALES
8      C
9      C
0      C   BIOMASA
1      Y(1) = 0.0012
2      Y(2) = 0.0012
3      Y(3) = 0.0012
4      Y(4) = 0.0012
5      C   AZUCARES CONSUMIDOS
6      Y(5) = 0.0
7      Y(6) = 0.0
8      Y(7) = 0.0
9      Y(8) = 0.0
0      C   FORMACION DE CO2
1      Y(9) = 0.0
2      Y(10) = 0.0
3      Y(11) = 0.0
4      Y(12) = 0.0
5      C   TEMPERATURA INICIAL EN LOS PUNTOS DE COLOCACION
6      Y(13) = 1./1.4
7      Y(14) = 1./1.4
8      C
9      C
0      C
1      C   MATRICES DE COLOCACION
2      B(1,1) = BR(1,1)-(BR(1,3)*AR(3,1))/(BI+AR(3,3))
3      B(1,2) = BR(1,2)-(BR(1,3)*AR(3,2))/(BI+AR(3,3))
4      B(2,1) = BR(2,1)-(BR(2,3)*AR(3,1))/(BI+AR(3,3))
5      B(2,2) = BR(2,2)-(BR(2,3)*AR(3,2))/(BI+AR(3,3))
6      A(1) = BR(1,3)*BI/(BI+AR(3,3))
7      A(2) = BR(2,3)*BI/(BI+AR(3,3))
8      J=0
9      C   NUMERO DE EDO SIMULTANEAS PARA RK45
0      N = 14
1      XPRINT = 100
2      XOUT = X
3      NEQN36 = 3 + 6*N
4      C
5      C
6      10  CALL RKF45(FSUB,N,Y,X,XOUT,ERRREL,ERRABS,IFLAG,WORK,IWORK,NEQN36)
7      C
8      J = X/100
9      IF(J.GE.15) GOTO 5
0      GOTO 7

```

5 F(J-14)=YC*CTE(6)
 F(J+2) =Y(13)*CTE(6)
 F(J+18)=Y(14)*CTE(6)

C F(J+34)=YW*CTE(6)
 TEMPERATURA EN °C

7 YC = YC * CTE(6)
 YW = YW * CTE(6)

C Y1 = Y(13) * CTE(6)
 Y2 = Y(14) * CTE(6)

C BIOMASA

BC =Y(1)* R1

B1 =Y(2)* R1

B2 =Y(3)* R1

BP =Y(4)* R1

C AZUCARES CONSUMIDOS

SC =Y(5)* R1

S1 =Y(6)* R1

S2 =Y(7)* R1

SP =Y(8)* R1

C FORMACION DE CO2

GC =Y(9)* R1

G1 =Y(10)* R1

G2 =Y(11)* R1

GP =Y(12)* R1

C IMPRESION DE RESULTADOS DE LA INTEGRACION

C WRITE(6,81)J,BC,81,B2,BP,YC,Y1,Y2,YW,IFLAG

GO TO (80,20,30,40,50,60,70,80), IFLAG

20 XOUT = X + XPRINT
 IF (X .LT. XFINAL) GO TO 10
 RETURN

30 WRITE (6,82) ERRREL, ERRABS
 GO TO 10

40 WRITE (6,83)
 GO TO 10

50 ERRABS = 1.0E-09
 WRITE (6,82) ERRREL, ERRABS
 GO TO 10

60 ERRREL = 10.0*ERRREL
 WRITE (6,82) ERRREL, ERRABS

IFLAG = 2

GO TO 10

70 WRITE (6,84)
 IFLAG = 2

GO TO 10

80 WRITE (6,85)
 STOP

C
 81 FORMAT (2X,F4.1,3X,4(2X,F4.1),3X,4(2X,F4.1),I2)
 82 FORMAT (' TOLERANCIAS REASIGNADAS ',2E12.3)
 83 FORMAT (' MUCHAS ETAPAS ')
 84 FORMAT (' MUCHAS SALIDAS ')
 85 FORMAT (' LOS PARAMETROS SON INVALIDOS ')
 86 FORMAT (//,3X,"Z",3X,"Y(1)",3X,"Y(2)",3X,"Y(3)",3X,"Y(4)",
 13X,"YCEN",5X,"Y5D",5X,"Y2",5X,"EVALS.FCN",/)
 END

C
 C
 C SUBROUTINE FSUB (X, Y, YP)

REAL X

```

1         DIMENSION Y(14),YP(14),CTE(20),AR(3,3),BR(3,3),A(2),B(2,2)
2         COMMON/A/AR,BR,CTE
3         COMMON/B/PM,DA,BI,B,A,CTE2,CTE4,R1,R2,UM,BIOMAX
4         COMMON/C/YC,YW
5         C   TEMPERATURA A LA PARED (YW) Y AL CENTRO (YC)
6         YW = (BI-AR(3,1)*Y(13)-AR(3,2)*Y(14))/(BI+AR(3,3))
7         YC = CTE(7)*Y(13)-CTE(8)*Y(14)+CTE(9)*YW
8         C   TEMPERATURA EN °C
9         E0=YC*CTE(6)
10        E1=Y(13)*CTE(6)
11        E2=Y(14)*CTE(6)
12        E3=YW*CTE(6)
13        C   FUNCIONALIDAD DE MU CTE O VAR(T)
14        IF(UM.EQ.CTE(1))GOTO 10
15        GO TO 20
16        C   MU=CONSTANTE
17        10   UM1=CTE(1)
18        UM2=CTE(1)
19        UM3=CTE(1)
20        UM4=CTE(1)
21        GO TO 30
22        C   MU(T) ARRHENIUS DOBLE
23        20   T0=E0+CTE(20)
24        T1=E1+CTE(20)
25        T2=E2+CTE(20)
26        T3=E3+CTE(20)
27        UM1=CTE(10)*EXP(-CTE(11)/(CTE(14)*T0))
28        UM1=UM1/(1+CTE(12)*EXP(-CTE(13)/(CTE(14)*T0)))
29        UM2=CTE(10)*EXP(-CTE(11)/(CTE(14)*T1))
30        UM2=UM2/(1+CTE(12)*EXP(-CTE(13)/(CTE(14)*T1)))
31        UM3=CTE(10)*EXP(-CTE(11)/(CTE(14)*T2))
32        UM3=UM3/(1+CTE(12)*EXP(-CTE(13)/(CTE(14)*T2)))
33        UM4=CTE(10)*EXP(-CTE(11)/(CTE(14)*T3))
34        UM4=UM4/(1+CTE(12)*EXP(-CTE(13)/(CTE(14)*T3)))
35        C   FUNCION DE K(T) POLINOMIO DE CUARTO ORDEN EN T
36        30   IF(BIOMAX.EQ.CTE(3))GOTO 40
37        C30=CTE(15)+CTE(16)*E0+CTE(17)*E0**2+CTE(18)*E0**3
38        C+CTE(19)*E0**4
39        C31=CTE(15)+CTE(16)*E1+CTE(17)*E1**2+CTE(18)*E1**3
40        C+CTE(19)*E1**4
41        C32=CTE(15)+CTE(16)*E2+CTE(17)*E2**2+CTE(18)*E2**3
42        C+CTE(19)*E2**4
43        C33=CTE(15)+CTE(16)*E3+CTE(17)*E3**2+CTE(18)*E3**3
44        C+CTE(19)*E3**4
45        GO TO 50
46        40   C30=1/CTE(3)
47        C31=1/CTE(3)
48        C32=1/CTE(3)
49        C33=1/CTE(3)
50        C   CRECIMIENTO LOGISTICO
51        50   YP(1) = UM1 * Y(1)*(1 - Y(1)/C30) /R1
52        YP(2) = UM2 * Y(2)*(1 - Y(2)/C31) /R1
53        YP(3) = UM3 * Y(3)*(1 - Y(3)/C32) /R1
54        YP(4) = UM4 * Y(4)*(1 - Y(4)/C33) /R1
55        C   CONSUMO DE AZUCARES CON MANTENIMIENTO
56        YP(5) = YP(1)/CTE2 + CTE4 * Y(1) /R1
57        YP(6) = YP(2)/CTE2 + CTE4 * Y(2) /R1
58        YP(7) = YP(3)/CTE2 + CTE4 * Y(3) /R1
59        YP(8) = YP(4)/CTE2 + CTE4 * Y(4) /R1
60        C   FORMACION DE CO2

```

YP(9) = YP(5)* R2

YP(10)= YP(6)* R2

YP(11)= YP(7)* R2

YP(12)= YP(8)* R2

C TEMPERATURA EN LOS PUNTOS DE COLOCACION

YP(13)= PM*(B(1,1)*Y(13)+B(1,2)*Y(14)+A(1))+ DA*YP(10)

YP(14)= PM*(B(2,1)*Y(13)+B(2,2)*Y(14)+A(2))+ DA*YP(11)

RETURN

END

C
C
C
C
C
C
C

SUBROUTINE RKF45(FSUB,NEQN,Y,T,TOUT,RELERR,ABSERR,IFLAG,WORK,
1 IWORK,NEQN36)

INTEGER NEQN,IFLAG,IWORK(5),NEQN36

REAL Y(NEQN),T,TOUT,RELERR,ABSERR,WORK(NEQN36)

EXTERNAL FSUB

INTEGER K1,K2,K3,K4,K5,K6,K1M

K1M=NEQN+1

K1 = K1M+1

K2 = K1+NEQN

K3 = K2+NEQN

K4 = K3+NEQN

K5 = K4+NEQN

K6 = K5+NEQN

CALL RKFS(FSUB,NEQN,Y,T,TOUT,RELERR,ABSERR,IFLAG,WORK(1),WORK(K1M)
1,WORK(K1),WORK(K2),WORK(K3),WORK(K4),WORK(K5),WORK(K6),
2WORK(K6+1),IWORK(1),IWORK(2),IWORK(3),IWORK(4),IWORK(5))

RETURN

END

SUBROUTINE RKFS(FSUB,NEQN,Y,T,TOUT,RELERR,ABSERR,IFLAG,YP,H,F1,F2
1,F3, F4,F5,SAVRE,SAVAE,NFE,KOP,INIT,JFLAG,KFLAG)

LOGICAL HFAILD,OUTPUT

INTEGER NEQN,IFLAG,NFE,KOP,INIT,JFLAG,KFLAG

REAL Y(NEQN),T,TOUT,RELERR,ABSERR,H,YP(NEQN),

1 F1(NEQN),F2(NEQN),F3(NEQN),F4(NEQN),F5(NEQN),SAVRE,

2 SAVAE

EXTERNAL FSUB

REAL A,AE,DT,EE,EEDET,ESTTOL,ET,HMIN,REMIN,RER,S,

1 SCALE,TOL,TOLN,U26,EPSP1,EPS,YPK

INTEGER K,MAXNFE,MFLAG

DATA REMIN/1.E-12/

DATA MAXNFE/10000/

IF (NEQN .LT. 1) GO TO 10

IF ((RELERR .LT. 0.0) .OR. (ABSERR .LT. 0.0)) GO TO 10

MFLAG=IABS(IFLAG)

IF ((MFLAG .EQ. 0) .OR. (MFLAG .GT. 8)) GO TO 10

IF (MFLAG .NE. 1) GO TO 20

EPS = 1.0

5 EPS = EPS/2.0

EPSP1 = EPS + 1.0

IF (EPSP1 .GT. 1.0) GO TO 5

U26 = 26.0*EPS

GO TO 50

10 IFLAG=8

RETURN

```

20 IF ((T .EQ. TOUT) .AND. (KFLAG .NE. 3)) GO TO 10
   IF (MFLAG .NE. 2) GO TO 25
   IF ((KFLAG .EQ. 3) .OR. (INIT .EQ. 0)) GO TO 45
   IF (KFLAG .EQ. 4) GO TO 40
   IF ((KFLAG .EQ. 5) .AND. (ABSERR .EQ. 0.0)) GO TO 30
   IF ((KFLAG .EQ. 6) .AND. (RELERR .LE. SAVRE) .AND.
1   (ABSERR .LE. SAVAE)) GO TO 30
   GO TO 50
25 IF (IFLAG .EQ. 3) GO TO 45
   IF (IFLAG .EQ. 4) GO TO 40
   IF ((IFLAG .EQ. 5) .AND. (ABSERR .GT. 0.0)) GO TO 45
30 STOP
40 NFE=0
   IF (MFLAG .EQ. 2) GO TO 50
45 IFLAG=JFLAG
   IF (KFLAG .EQ. 3) MFLAG=IABS(IFLAG)
50 JFLAG=IFLAG
   KFLAG=0
   SAVRE=RELERR
   SAVAE=ABSERR
   RER=2.0*EPS+REMIN
   IF (RELERR .GE. RER) GO TO 55
   RELERR=RER
   IFLAG=3
   KFLAG=3
   RETURN
55 DT=TOUT-T
   IF (MFLAG .EQ. 1) GO TO 60
   IF (INIT .EQ. 0) GO TO 65
   GO TO 80
60 INIT=0
   KOP=0
   A=T
   CALL FSUB(A,Y,YP)
   NFE=1
   IF (T .NE. TOUT) GO TO 65
   IFLAG=2
   RETURN
65 INIT=1
   H=ABS(DT)
   TOLN=0.
   DO 70 K=1,NEQN
     TOL=RELERR*ABS(Y(K))+ABSERR
     IF (TOL .LE. 0.) GO TO 70
     TOLN=TOL
     YPK=ABS(YP(K))
     IF (YPK*H**5 .GT. TOL) H=(TOL/YPK)**0.2
70 CONTINUE
   IF (TOLN .LE. 0.0) H=0.0
   H=AMAX1(H,U26*AMAX1(ABS(T),ABS(DT)))
   JFLAG=ISIGN(2,IFLAG)
80 H=SIGN(H,DT)
   IF (ABS(H) .GE. 2.0*ABS(DT)) KOP=KOP+1
   IF (KOP .NE. 100) GO TO 85
   KOP=0
   IFLAG=7
   RETURN
85 IF (ABS(DT) .GT. U26*ABS(T)) GO TO 95
   DO 90 K=1,NEQN

```

90 Y(K)=Y(K)+DT*YP(K)

143

A=TOUT

CALL FSUB(A,Y,YP)

NFE=NFE+1

GO TO 300

C
C

INITIALIZE OUTPUT POINT INDICATOR

C

95 OUTPUT= .FALSE.

C

TO AVOID PREMATURE UNDERFLOW IN THE ERROR TOLERANCE FUNCTION,
SCALE THE ERROR TOLERANCES

C

SCALE=2.0/RELERR

AE=SCALE*ABSERR

C
C

STEP BY STEP INTEGRATION

C

100 HFAILD= .FALSE.

C

SET SMALLEST ALLOWABLE STEPSIZE

C

HMIN=U26*ABS(T)

C

ADJUST STEPSIZE IF NECESSARY TO HIT THE OUTPUT POINT.

C

LOOK AHEAD TWO STEPS TO AVOID DRASTIC CHANGES IN THE STEPSIZE AND
THUS LESSEN THE IMPACT OF OUTPUT POINTS ON THE CODE.

C

C

DT=TOUT-T

IF (ABS(DT) .GE. 2.0*ABS(H)) GO TO 200

IF (ABS(DT) .GT. ABS(H)) GO TO 150

C

C

THE NEXT SUCCESSFUL STEP WILL COMPLETE THE INTEGRATION TO THE
OUTPUT POINT

C

C

OUTPUT= .TRUE.

H=DT

GO TO 200

C

150 H=0.5*DT

C

200 IF (NFE .LE. MAXNFE) GO TO 220

C

C

TOO MUCH WORK

IFLAG=4

KFLAG=4

RETURN

C

C

ADVANCE AN APPROXIMATE SOLUTION OVER ONE STEP OF LENGTH H

C

220 CALL FEHL(FSUB,NEQN,Y,T,H,YP,F1,F2,F3,F4,F5,F1)

NFE=NFE+5

C

C

COMPUTE AND TEST ALLOWABLE TOLERANCES VERSUS LOCAL ERROR ESTIMATES
AND REMOVE SCALING OF TOLERANCES. NOTE THAT RELATIVE ERROR IS
MEASURED WITH RESPECT TO THE AVERAGE OF THE MAGNITUDES OF THE
SOLUTION AT THE BEGINNING AND END OF THE STEP.

C

EEOET=0.0 144

DO 250 K=1,NEQN

ET=ABS(Y(K))+ABS(F1(K))+AE

IF (ET .GT. 0.0) GO TO 240

C

C

INAPPROPRIATE ERROR TOLERANCE

IFLAG=5

RETURN

C

240 EE=ABS((-2090.0*YP(K)+(21970.0*F3(K)-15048.0*F4(K)))+
1 (22528.0*F2(K)-27360.0*F5(K)))

250 EEOET=AMAX1(EEOET,EE/ET)

C

ESTTOL=ABS(H)*EEOET*SCALE/752400.0

C

IF (ESTTOL .LE. 1.0) GO TO 260

C

C

C

UNSUCCESSFUL STEP

C

REDUCE THE STEPSIZE , TRY AGAIN

C

THE DECREASE IS LIMITED TO A FACTOR OF 1/10

C

HFAILD= .TRUE.

OUTPUT= .FALSE.

S=0.1

IF (ESTTOL .LT. 59049.0) S=0.9/ESTTOL**0.2

H=S*H

IF (ABS(H) .GT. HMIN) GO TO 200

C

C

REQUESTED ERROR UNATTAINABLE AT SMALLEST ALLOWABLE STEPSIZE

IFLAG=6

KFLAG=6

RETURN

C

C

SUCCESSFUL STEP

C

C

STORE SOLUTION AT T+H

C

AND EVALUATE DERIVATIVES THERE

260 T=T+H

DO 270 K=1,NEQN

270 Y(K)=F1(K)

A=T

CALL FSUB(A,Y,YP)

NFE=NFE+1

C

C

C

CHOOSE NEXT STEPSIZE

C

THE INCREASE IS LIMITED TO A FACTOR OF 5

C

IF STEP FAILURE HAS JUST OCCURRED, NEXT

C

STEPSIZE IS NOT ALLOWED TO INCREASE

C

S=5.0

IF (ESTTOL .GT. 1.889568E-4) S=0.9/ESTTOL**0.2

IF (HFAILD) S=AMIN1(S,1.0)

H=SIGN(AMAX1(S*ABS(H),HMIN),H)

C

C

END OF CORE INTEGRATOR

C

C

```

C      SHOULD WE TAKE ANOTHER STEP
C
      IF (OUTPUT) GO TO 300
      IF (IFLAG .GT. 0) GO TO 100
C
C      INTEGRATION SUCCESSFULLY COMPLETED
C
C      ONE-STEP MODE
      IFLAG=-2
      RETURN
C
C      INTERVAL MODE
300  T=TOUT
      IFLAG=2
      RETURN
C
      END
      SUBROUTINE FEHL(F,NEQN,Y,T,H,YP,F1,F2,F3,F4,F5,S)
C
      INTEGER NEQN
      REAL Y(NEQN),T,H,YP(NEQN),F1(NEQN),F2(NEQN),
1     F3(NEQN),F4(NEQN),F5(NEQN),S(NEQN)
C
      REAL CH
      INTEGER K
C
      CH=H/4.0
      DO 221 K=1,NEQN
221   F5(K)=Y(K)+CH*YP(K)
      CALL FSUB(T+CH,F5,F1)
C
      CH=3.0*H/32.0
      DO 222 K=1,NEQN
222   F5(K)=Y(K)+CH*(YP(K)+3.0*F1(K))
      CALL FSUB(T+3.0*H/8.0,F5,F2)
C
      CH=H/2197.0
      DO 223 K=1,NEQN
223   F5(K)=Y(K)+CH*(1932.0*YP(K)+(7296.0*F2(K)-7200.0*F1(K)))
      CALL FSUB(T+12.0*H/13.0,F5,F3)
C
      CH=H/4104.0
      DO 224 K=1,NEQN
224   F5(K)=Y(K)+CH*((8341.0*YP(K)-845.0*F3(K))+
1     (29440.0*F2(K)-32832.0*F1(K)))
      CALL FSUB(T+H,F5,F4)
C
      CH=H/20520.0
      DO 225 K=1,NEQN
225   F1(K)=Y(K)+CH*((-6080.0*YP(K)+(9295.0*F3(K)-
1     5643.0*F4(K)))+(41040.0*F1(K)-28352.0*F2(K)))
      CALL FSUB(T+H/2.0,F1,F5)
C
C      COMPUTE APPROXIMATE SOLUTION AT T+H
C
      CH=H/7618050.0
      DO 230 K=1,NEQN
230   S(K)=Y(K)+CH*((902880.0*YP(K)+(3855735.0*F3(K)-
1     1371249.0*F4(K)))+(3953664.0*F2(K)+

```

277020.0*F5(K))

2

C

RETURN
END

1
2
3
4

0.3,0.55,3.3,0.07,830.,35.,1.558078205¹⁴⁸,0.8914115379,0.3333333
2.694334E11,70225.,1.300653E47,283356.,3.314
-1.16637597,0.0737289418,-1.20761224E-04,-3.79236331E-05
4.39666391E-07,273.15
0.393765191,0.803087153,1.
-2.53958456,3.8256163,-1.28603174
-1.37767678,-1.24519489,2.62287168
1.71547606,-9.71547609,8.
-9.90238118,12.2996598,-2.39727365
9.03367355,-32.7642856,23.7306121
22.757482,-65.4241488,42.6666669
40.1,41.9,44.7,47.7,49.0,49.2,48.6,48.5
48.1,48.2,46.7,46.3,45.4,44.1,41.9,39.7
38.3,38.7,42.6,45.6,46.7,47.2,46.7,46.6
46.4,46.6,45.7,44.5,43.9,42.5,40.4,38.3
36.2,37.2,38.7,41.0,41.9,42.2,41.3,41.0
40.7,40.9,40.7,39.4,39.1,38.9,38.0,37.1
34.9,35.7,37.1,38.4,38.6,38.4,37.5,37.2
37.5,37.4,37.5,36.6,36.8,36.6,36.1,35.6
64,3,1
0.0249592,3.5442,10.5270

0.3,0.55,3.3,0.07,830.,35.,1.553078205,0.8914115374,0.3333333

2.694334E11,70225.,1.300653E47,283356.,0.314

-1.16637597,0.0737289418,-1.20761224E-04,-3.79236331E-05

4.39666391E-07,273.15

0.393765191,0.803087153,1.

-2.53958456,3.8256163,-1.28603174

-1.37767678,-1.24519489,2.62287163

1.71547606,-9.71547609,3.

-9.90238118,12.2996598,-2.39727865

9.03367355,-32.7642856,23.7306121

22.757482,-65.4241488,42.6666669

37.8,38.5,40.0,42.5,44.4,45.0,47.1,48.0

48.2,48.4,49.5,47.8,47.4,46.3,45.2,44.1

37.0,38.2,39.4,41.5,43.0,43.6,45.7,46.6

46.9,47.1,48.2,46.4,45.6,45.1,44.6,44.1

35.0,35.2,36.3,37.8,39.0,40.2,41.5,42.4

42.4,42.5,43.0,41.8,39.7,39.0,38.3,37.6

34.0,34.0,35.6,36.6,38.0,38.8,40.2,40.9

40.9,40.6,40.9,39.8,38.0,37.6,37.2,36.8

64,3,1

0.346292E-01,3.970542,5.20361

JUL 28, 1987, 5:30 PM

151

SEL: JSC ACCOUNT: 00904A01

EXT FILE NAME: MUMAX.LACTICO.00904A01

EXT FILE NAME: MUMAX.LACTICO.00904A01

ILL NUMBERED

RECORD LENGTH: 90 BYTES

NUMBER OF RECORDS: 390

ILL CODE: 0

5. PROGRAMA DE ESTIMACION DE PARAMETROS DE U MAXIMA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

```

1  SCONTROL NSLI IIT, NOSOURCE
2  C  PROGRAMA DE ESTIMACION DE PARAMETROS DE MUMAX EN FUNCION DE TEMP
3  DIMENSION SIGNS(4), DIFF(4), SCRAT(114), T(13), TH(4), Y(13)
4  COMMON T
5  EXTERNAL MODEL
6  READ(5,*) NOB, NP
7  DO 1 I=1, NP
8  READ(5,*) TH(I)
9  1  CONTINUE
10 DO 2 I=1, NOB
11 READ(5,*) T(I), Y(I)
12 2  CONTINUE
13 IT=100
14 DO 4 I=1, NP
15 DIFF(I)=.31
16 SIGNS(I)=1.
17 4  CONTINUE
18 EPS1=1.E-17
19 EPS2=1.E-05
20 XLAM=0.01
21 CALL HAUS(1, MODEL, NOB, Y, NP, TH, DIFF, SIGNS, EPS1,
22 1E-05, II, XLAM, 10., SCRAT)
23 STOP
24 END
25 SUBROUTINE HAUS(NPROB, MODEL, NOB, Y, NP, TH, DIFF, SIGNS,
26 1 EPS1, EPS2, MIT, FLAM, FNU, SCRAT)
27 DIMENSION SCRAT(1), DIFF(1), SIGNS(1), TH(1), Y(1)
28 EXTERNAL MODEL
29 IA=1
30 IB=IA+NP
31 IC=IB+NP
32 ID=IC+NP
33 IE=ID+NP
34 IF=IE+NP
35 IG=IF+NOB
36 IH=IG+NOB
37 II = IH + NP * NOB
38 IJ = IH
39 CALL HAUS59(NPROB, MODEL, NOB, Y, NP, TH, DIFF, SIGNS, EPS1, EPS2, M
40 1 , FLAM, FNU, SCRAT(IA), SCRAT(IB), SCRAT(IC), SCRAT(ID),
41 2 SCRAT(IE), SCRAT(IF), SCRAT(IG), SCRAT(IH), SCRAT(II),
42 3 SCRAT(IJ) )
43 RETURN
44 END
45 SUBROUTINE HAUS59(NPROB0, MODEL, NBO, Y, NO, TH, DIFZ, SIGNS, EPS1, EPS2,
46 1, MIT, FLAM, FNU, Q, P, E, PHI, TB, F, R, A, D, DELZ)
47 C  FORTRAN II VERSION
48 C  H. J. WERTZ
49 C  ADAPTED FOR THE CDC 6400 (J. F. MACGREGOR)
50 C
51 C  DIMENSION TH(NQ), DIFZ(NQ), SIGNS(NQ), Y(NBO)
52 C  DIMENSION G(NQ), P(NQ), E(NQ), PHI(NQ), TB(NQ)
53 C  DIMENSION R(NBO), F(NBO)
54 C  DIMENSION A(NQ, NQ), D(NQ, NQ), DELZ(NBO, NQ)
55 C  DIMENSION TH(1), Y(1), DIFZ(1), SIGNS(1), J(1), P(1), E(1),
56 1 PHI(1), TB(1), F(1), R(1), A(1), D(1), DELZ(1)
57 DIMENSION DUM1(10), DUM2(100), DUM3(10)
58 EXTERNAL MODEL
59 ARCOS(X) = ATAN(SQRT(1.0/X**2 - 1.0))
60 NP = NP

```

```

01 153
02 NPROB = NPROB0
03 NOB = NOB0
04 EPS1 = EPS10
05 EPS2 = EPS20
06 NPSQ = NP * NF
07 HISCRA = 5*NP+HPSQ + 2*NOB+NF*NOB
08 WRITE(6,1000) NPROB, NOB, NP, HISCRA
09 WRITE(6,1001)
10 CALL GASS60(1, NP, TH, DUM1, DUM2)
11 WRITE(6,1002)
12 CALL GASS60(1, NP, DIFZ, DUM1, DUM2)
13 IF(MIN0(NP-1, 50-NP, NOB-NP, MIT-1, 999-MIT)) 99, 15, 15
14 15 IF(FNU-1.0) 99, 99, 16
15 16 CONTINUE
16 DO 19 I=1, NP
17 TEMP = ABS(DIFZ(I))
18 IF(AMIN1(1.0-TEMP, ABS(TH(I)))) 99, 99, 19
19 19 CONTINUE
20 GA = FLAT
21 WIT = 1
22 LAOS=0
23 IF(EPS1) 5, 70, 70
24 5 EPS1 = 0
25 70 SSO = 0
26 CALL MODEL(NPROB, TH, F, NOB, NP)
27 DO 90 I = 1, NOB
28 R(I) = Y(I) - F(I)
29 90 SSO=SSO+R(I)*R(I)
30 WRITE(6,1003) SSO
31 C
32 C
33 100 GA = GA / FNU
34 INTCNT = 0
35 WRITE(6,1004) WIT
36 101 JS = 1 - NOB
37 DO 130 J=1, NP
38 TEMP = TH(J)
39 P(J)=DIFZ(J)*TH(J)
40 TH(J)= TH(J)+P(J)
41 Q(J)=0
42 JS = JS + NOB
43 CALL MODEL(NPROB, TH, DELZ(JS), NOB, NP)
44 IJ = JS-1
45 DO 120 I = 1, NOB
46 IJ = IJ + 1
47 DELZ(IJ) = DELZ(IJ) - F(I)
48 120 Q(J) = Q(J) + DELZ(IJ) * R(I)
49 Q(J)= Q(J)/P(J)
50 C
51 C
52 O=XT*R (STEEPEST DESCENT)
53 130 TH(J) = TEMP
54 IF(LAOS) 131, 131, 414
55 131 DO 150 I = 1, NP
56 DO 151 J=1, I
57 SUM = 0
58 KJ = NOB*(J-1)
59 KI = NOB*(I-1)
60 DO 160 K = 1, NOB
61 KI = KI + 1
62 KJ = KJ + 1
63 160 SUM = SUM + DELZ(KI) * DELZ(KJ)

```

```

121      TEMP= SUM/(P(I)*P(J))
122      JI = J + NP*(I-1)
123      D(JI) = TEMP
124      IJ = I + NP*(J-1)
125      151 D(IJ) = TEMP
126      150 E(I) = SQRT(D(JI))
127      666 CONTINUE
128      DO 153 I = 1, NP
129      IJ = I-NP
130      DO 153 J=1,I
131      IJ = IJ + NP
132      A(IJ) = D(IJ) / (E(I)*E(J))
133      JI = J + NP*(I-1)
134      153 A(JI) = A(IJ)
135      C
136      II = - NP
137      DO 155 I=1, NP
138      P(I)=D(I)/E(I)
139      PHI(I)=P(I)
140      II = NP + 1 + II
141      155 A(II) = A(II) + GA
142      C
143      I=1
144      CALL MATR(A, NP, NP, I, DET)
145      C
146      STEP=1.0
147      SUM1=0.
148      SUM2=0.
149      SUM3=0.
150      DO 231 I=1,NP
151      SUM1=P(I)*PHI(I)+SUM1
152      SUM2=P(I)*P(I)+SUM2
153      SUM3= PHI(I) * PHI(I) + SUM3
154      231 PHI(I) = P(I)
155      TEMP = SUM1/SQRT(SUM2*SUM3)
156      TEMP = AMIN1(TEMP, 1.0)
157      TEMP = 57.295*ARCOS(TEMP)
158      WRITE(6,1041) DET, TEMP
159      170 DO 220 I = 1, NP
160      P(I) = PHI(I) *STEP / E(I)
161      TB(I)= Th(I) + P(I)
162      220 CONTINUE
163      WRITE(6,7000)
164      7000 FORMAT(30H0TEST POINT PARAMETER VALUES )
165      WRITE(6,2006) (TB(I), I = 1, NP)
166      DO 221 I = 1, NP
167      IF(SIGNS(I)) 221, 221, 222
168      222 IF(SIGN(1.0,TH(I))*SIGN(1.0,TB(I))) 663, 221, 221
169      221 CONTINUE
170      SUMB=0
171      CALL MODEL(NPROB, TD, F, JOB, NP)
172      DO 230 I=1, JOB
173      R(I)=Y(I)-F(I)
174      230 SUMB=SUMB+R(I)*R(I)
175      WRITE(6,1043) SUMB
176      IF(SUMB - (1.0+EPS1)*660) 662, 662, 663
177      663 IF( AMIN1(TEMP-30.0, GA)) 665, 665, 664
178      665 STEP=STEP/2.0
179      INTCNT = INTCNT + 1
180      IF(INTCNT - 36) 170, 2700, 2700

```

A= SCALED MOMENT MATRIX

P/E = CORRECTION VECTOR

```

81      664 GA=GA*FNU
82          INTCNT = INTCNT + 1
83          IF(INTCNT = 30) 666, 2700, 2700
84      662 WRITE(6,1007)
85          DO 669 I=1, NP
86      669 TH(I)=TB(I)
87          CALL GASS60(1, NP, TH, DUM1, DUM2)
88          WRITE(6,1040) GA, SUMB
89          IF(EPS2) 229, 229, 225
90      229 IF(EPS1) 270, 270, 265
91      225 DO 240 I = 1, NP
92          IF(ABS(P(I))/(1.E-20+ABS(TH(I)))-EPS2) 240, 240, 241
93      241 IF(EPS1) 270, 270, 265
94      240 CONTINUE
95          WRITE(6,1009) EPS2
96          GO TO 230
97      265 IF(ABS(SUMB - SSQ) - EPS1*SSQ) 266, 266, 270
98      266 WRITE(6,1010) EPS1
99          GO TO 230
100      270 SSQ=SUMB
101          NIT=NIT+1
102          IF(NIT - NIT) 100, 100, 280
103      2700 WRITE(6,2710)
104      2710 FORMAT(/'11590**** THE SUM OF SQUARES CANNOT BE REDUCED TO THE SUM
105          OF SQUARES AT THE END OF THE LAST ITERATION - ITERATING STOPS /)
106      C
107      C
108      C
109      280 WRITE(6,1011)
110          WRITE(6,2001) (F(I), I = 1, NOB)
111          WRITE(6,1012)
112          WRITE(6,2001) (R(I), I = 1, NOB)
113          SSQ=SUMB
114          IDF=NOB-NP
115          WRITE(6,1015)
116          I=0
117          CALL MATIN(0, NP, P, I, DET)
118          DO 7692 I=1, NP
119          II = I + NP*(I-1)
120      7692 E(I) = SGRT(D(II))
121          DO 340 I=1, NP
122          JI = I + NP*(I-1) - 1
123          IJ = I + NP*(I-2)
124          DO 340 J = I, NP
125          JI = JI + 1
126          A(JI) = D(JI) / (E(I)*E(J))
127          IJ = IJ + NP
128      340 A(IJ) = A(JI)
129          CALL GASS60(3, NP, DUM13, DUM1, A)
130          WRITE(6,1016)
131          CALL GASS60(1, NP, E, DUM1, DUM2)
132          IF(IDF) 341, 410, 341
133      341 SDEV = SSQ / IDF
134          WRITE(6,1014) SDEV, IDF
135          SDEV = SQRT(SDEV)
136          DO 391 I=1, NP
137          P(I)=TH(I)+2.0*E(I)*SDEV
138      391 TB(I)=TH(I)-2.0*E(I)*SDEV
139          WRITE(6,1039)
140          CALL GASS60(2, NP, TB, P, DUM2)

```

```

241      LA03=1
242      GO TO 101
243      414 DO 415 K = 1, N005
244      TEMP = 0
245      DO 420 I=1, NP
246      DO 420 J=1, NP
247      ISUB = K+N005*(I-1)
248      DEB0G1 = DELZ(ISUB)
249      C    DEB0G1 = DELZ(K + N0B*(I-1))
250      ISUB = K+N005*(J-1)
251      DEB0G2 = DELZ(ISUB)
252      C    DEB0G2 = DELZ(K + N0B*(J-1))
253      IJ = I + NP*(J-1)
254      DEB0G3 = 0(IJ)/(DIFZ(I)*TH(I)*DIFZ(J)*TH(J))
255      420 TEMP = TEMP + DEB0G1 * DEB0G2 * DEB0G3
256      TEMP = 2.0*SQRT(TEMP) *SDEV
257      R(K)=F(K)+TEMP
258      415 F(K)=F(K)-TEMP
259      WRITE(6,1006)
260      IE=0
261      DO 425 I=1,N005,10
262      IE=IE+10
263      IF(N005-IE) 430,435,435
264      430 IE=000
265      435 WRITE(6,2001) (R(J), J= I, IE)
266      425 WRITE(6,2006) (F(J), J = I, IE)
267      410 WRITE(6,1033) NPROB
268      RETURN
269      99 WRITE(6,1034)
270      GO TO 410
271      1000 FORMAT(38H1100N-LINEAR ESTIMATION, PROBLEM NUMBER  I3, // I5,
272      1  14H OBSERVATIONS, I5, 11H PARAMETERS  I14, 17H SCRATCH REQUIR
273      1001 FORMAT(/25H0INITIAL PARAMETER VALUES  )
274      1002 FORMAT(/54H0PROPORTIONS USED IN CALCULATING DIFFERENCE QUOTIENT
275      1003 FORMAT(/25H0INITIAL SUM OF SQUARES =  E12.4)
276      1004 FORMAT(/////45X,13HITERATION NO.  I4)
277      1007 FORMAT(/32H0PARAMETER VALUES VIA REGRESSION  )
278      1008 FORMAT(/////54H0APPROXIMATE CONFIDENCE LIMITS FOR EACH FUNCTION
279      1009 )
280      1009 FORMAT(/62H0ITERATION STOPS - RELATIVE CHANGE IN EACH PARAMETER
281      1010 )
282      1010 FORMAT(/62H0ITERATION STOPS - RELATIVE CHANGE IN SUM OF SQUARES
283      1011 )
284      1011 FORMAT(/22HIFINAL FUNCTION VALUES  )
285      1012 FORMAT(/////10H0RESIDUALS  )
286      1014 FORMAT(/24H0VARIANCE OF RESIDUALS =  ,E12.4,1H,I4,
287      120H DEGREES OF FREEDOM  )
288      1015 FORMAT(/////19H0CORRELATION MATRIX  )
289      1016 FORMAT(/////21H0NORMALIZING ELEMENTS  )
290      1033 FORMAT(/19H0END OF PROBLEM NO.  I3)
291      1034 FORMAT(/16H0PARAMETER ERROR  )
292      1039 FORMAT(/71H0INDIVIDUAL CONFIDENCE LIMITS FOR EACH PARAMETER (U
293      1040 )
294      1040 FORMAT(/,1X,'LAMBDA =',E10.3,5X,'SUM OF SQUARES AFTER REGRESSI
295      1E15.7)
296      1041 FORMAT(14H DETERMINANT = E12.4, 6X, 25H ANGLE IN SCALED COORD.
297      1  F5.2, 6HDEGREES  )
298      1043 FORMAT(28H0TEST PRINT SUM OF SQUARES =  E12.4)
299      2001 FORMAT(/5E12.4)
300      2006 FORMAT(/5E12.4)

```

```

501      END
502      SUBROUTINE RAT10(AA, NVAR, BB, NB, DET)
503      DIMENSION A(NVAR,NVAR), B(NVAR,1), AA(1), BB(1)
504      DO 1 I=1,NVAR
505      B(I,1)=BB(I)
506      DO 1 J=1,NVAR
507      1 A(J,I)=AA(J+NVAR*(I-1))
508      PIVOTM = A(1,1)
509      DET = 1.0
510      DO 550 ICOL = 1, NVAR
511      PIVOT = A(ICOL, ICOL)
512      PIVOTM = AMIN1(PIVOT, PIVOTM)
513      DET = PIVOT * DET
514      C
515      C   DIVIDE PIVOT ROW BY PIVOT ELEMENT
516      C
517      A(ICOL, ICOL) = 1.0
518      PIVOT = AMAX1(PIVOT, 1.E-20)
519      PIVOT = A(ICOL, ICOL)/PIVOT
520      DO 350 L=1, NVAR
521      350 A(ICOL, L) = A(ICOL,L)*PIVOT
522      IF(NB .EQ. 0) GO TO 371
523      DO 370 L=1,NB
524      370 B(ICOL, L) = B(ICOL, L)*PIVOT
525      C
526      C   REDUCE NON-PIVOT ROWS
527      C
528      371 DO 550 L1=1,NVAR
529      IF(L1 .EQ. ICOL) GO TO 550
530      T = A(L1, ICOL)
531      A(L1, ICOL) = 0.
532      DO 450 L=1,NVAR
533      450 A(L1, L) = A(L1, L) - A(ICOL, L)*T
534      IF(NB .EQ. 0) GO TO 550
535      DO 500 L=1,NB
536      500 B(L1, L) = B(L1, L)-B(ICOL,L)*T
537      550 CONTINUE
538      DO 3 I=1,NVAR
539      BB(I)=B(I,1)
540      DO 3 J=1,NVAR
541      3 AA(J+NVAR*(I-1))=A(J,I)
542      RETURN
543      END
544      SUBROUTINE GASS60(ITYPE,NG,A,B,D)
545      DIMENSION A(10),B(10),D(100),C(10,10)
546      NP = NG
547      NR = NP/10
548      LOW = 1
549      LUP = 10
550      10 IF( NR )15,20,30
551      15 RETURN
552      20 LUP=NP
553      IF(LOW .GT. LUP) RETURN
554      30 WRITE(6,500) (J,J=LOW,LUP)
555      GO TO (40,60,80),ITYPE
556      40 WRITE(6,600) (A(J),J=LOW,LUP)
557      GO TO 100
558      60 WRITE(6,600) (B(J),J=LOW,LUP)
559      GO TO 10
560      80 CONTINUE

```

```
361      DO 85 I=1, NP
362      DO 85 J=1, NP
363      85 C(J, I)=0 (J+NP*(I-1))
364      DO 90 I=LOW, LUP
365      90 WRITE(6, 720) I, (C(J, I), J=LOW, I)
366      LOW2=LUP+1
367      IF (LOW2 .GT. NP) GO TO 100
368      DO 95 I=LOW2, NP
369      95 WRITE(6, 720) I, (C(J, I), J=LOW, LUP)
370      100 LOW = LOW + 10
371      LUP = LUP + 10
372      NR = NR - 1
373      GO TO 10
374      500 FORMAT(/I6, 9I12)
375      600 FORMAT( 5E13.7)
376      720 FORMAT(100, I3, 1X, 5F12.4, /5X, 5F12.4)
377      1 CONTINUE
378      RETURN
379      END

380      SUBROUTINE MODEL(NPROB, TH, F, NDB, NP)
381      DIMENSION T(15), TH(4), F(15)
382      COMMON T
383      REAL T, F
384      DO 20 I=1, NDB
385      A = TH(1)*1E12 * EXP(-TH(2)*1E05/(8.312*T(I)))
386      B = 1 + TH(3)*1E48*EXP(-TH(4)*1E06/(8.312*T(I)))
387      F(I)=A/B
388      20 CONTINUE
389      RETURN
390      END
```


1	13,4
2	0.2694296
3	0.7022478
4	0.1301814
5	0.2833502
6	298.15, 0.1077
7	300.65, 0.1296
8	303.15, 0.1787
9	305.65, .2399
10	308.15, 0.30
11	310.65, 0.3401
12	311.90, 0.3404
13	313.15, 0.34
14	314.40, 0.3178
15	315.65, 0.2767
16	316.90, 0.2130
17	318.15, 0.1249
18	319.15, 0.0333

APENDICE IV

DATOS DEL EFECTO DE COMPOSICION

DATOS DEL EFECTO DE COMPOSICION EN EL EXPERIMENTO FACTORIAL (5.4) PARA ESTUDIAR EL EFECTO DEL CLORURO DE CALCIO, SULFATO DE AMONIO Y BAGAZO DE CAÑA EN EL ENSILAJE DE YUCA ADICIONADA CON LACTOBACILOS

CONTENIDO

1. VARIACION DEL PH EN EL TIEMPO DE FERMENTACION 162
2. VARIACION DE LA ACIDEZ TOTAL TITULABLE EN BASE A
MATERIA SECA TOTAL 163
3. VARIACION DE LA ACIDEZ TOTAL TITULABLE EN BASE A
YUCA SECA INICIAL 163

1. VARIACION DEL PH EN EL TIEMPO DE FERMENTACION

EXP R	T I E M P O (Horas)						
	0	4	21	44.5	68.5	93	
1	0	5.22 ± 0.02	4.27 ± 0.02	3.67 ± 0.07	3.72 ± 0.02	3.57 ± 0.02	
2	0	5.40 ± 0.05	4.33 ± 0.04	3.55 ± 0.08	3.77 ± 0.03	3.63 ± 0.03	
3	0	5.13 ± 0.02	5.07 ± 0.03	3.60 ± 0.05	3.77 ± 0.02	3.60 ± 0.02	
4	0	5.32 ± 0.02	5.00 ± 0.05	3.57 ± 0.03	3.78 ± 0.02	3.70 ± 0.02	
5	0	5.85 ± 0.06	5.02 ± 0.04	3.55 ± 0.00	3.80 ± 0.00	3.72 ± 0.02	
6	0	5.79 ± 0.07	4.33 ± 0.02	3.56 ± 0.01	3.82 ± 0.02	3.72 ± 0.02	
7	0	5.43 ± 0.03	4.93 ± 0.02	3.60 ± 0.15	3.73 ± 0.02	3.58 ± 0.02	
8	0	5.83 ± 0.05	4.75 ± 0.23	3.93 ± 0.03	3.82 ± 0.02	3.68 ± 0.02	

2. VARIACION DE LA ACIDEZ TOTAL TITULABLE EN BASE A MATERIA SECA TOTAL

EXP		T I E M P O (Horas)				
R	0	4	21	44.5	68.5	93
1	0	-	15.5 ± 0.7	21.0 ± 0.4	26.6 ± 0.9	28.2 ± 0.9
2	0	-	10.5 ± 1.8	21.1 ± 1.3	23.1 ± 1.6	24.7 ± 1.5
3	0	-	7.9 ± 0.2	19.3 ± 1.1	23.9 ± 1.0	24.1 ± 0.5
4	0	-	11.1 ± 0.9	19.7 ± 0.3	22.8 ± 0.6	24.9 ± 0.6
5	0	-	10.5 ± 1.5	25.4 ± 0.3	26.6 ± 0.3	30.5 ± 1.4
6	0	-	13.7 ± 0.1	21.7 ± 1.1	25.5 ± 0.8	25.5 ± 2.6
7	0	-	11.2 ± 2.0	22.1 ± 0.6	27.6 ± 0.5	30.1 ± 1.8
8	0	-	10.3 ± 2.2	22.0 ± 0.1	24.5 ± 0.4	22.6 ± 1.8

3. VARIACION DE LA ACIDEZ TOTAL TITULABLE EN BASE A YUCA SECA INICIAL

EXP		T I E M P O (Horas)				
R	0	4	21	44.5	68.5	93
1	0	-	18.0 ± 0.8	24.3 ± 0.5	30.5 ± 0.7	32.7 ± 1.0
2	0	-	11.6 ± 0.3	23.3 ± 1.5	25.4 ± 1.7	27.2 ± 1.7
3	0	-	10.9 ± 0.3	26.6 ± 1.5	32.8 ± 1.3	33.1 ± 0.7
4	0	-	13.3 ± 1.1	23.6 ± 0.3	27.3 ± 0.7	29.8 ± 0.7
5	0	-	13.1 ± 1.9	31.6 ± 0.4	32.7 ± 0.5	37.9 ± 1.7
6	0	-	16.9 ± 0.2	26.8 ± 1.4	31.6 ± 1.0	31.6 ± 3.2
7	0	-	13.7 ± 2.4	26.8 ± 0.8	33.5 ± 0.6	35.7 ± 1.5
8	0	-	11.2 ± 2.4	24.0 ± 0.1	26.7 ± 0.4	23.8 ± 1.8

APENDICE V

DATOS DE ESCALAMIENTO
DE ENSILAJE

AFENDICE V**DATOS DE ESCALAMIENTO DE ENSILAJE****CONTENIDO**

1. VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL SILO DE 1 KG	166
2. VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL SILO DE 15 KG	167
3. VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL SILO DE 40 KG	167
4. VARIACION DE LA TEMPERATURRA EN EL SILO DE 40 KG ELABORADO CON YUCA FRESCA	168
5. VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL SILO DE 90 KG	169

VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL INTERIOR
DEL SILO DE 1 KG

R=3 CM H=35 CM L/D=6 D/DP=75-100

TIEMPO	TEMPERATURA (°C) @ Z=0.5			DELTA T
	PARED	CENTRO	T BANO	CTO-PRD
0.00	26.80	26.10	30.00	-0.70
0.50	28.90	27.00	30.00	-1.90
0.75	30.00	29.00	30.00	-1.00
1.00	30.00	29.60	30.00	-0.40
1.25	29.90	29.80	30.00	-0.10
1.50	30.10	30.10	30.00	0.00
1.75	30.10	30.10	30.00	0.00
2.00	30.20	30.20	30.00	0.00
2.25	30.10	30.00	30.00	-0.10
2.50	30.60	30.80	30.00	0.20
2.75	30.20	30.50	30.00	0.30
3.00	30.20	30.60	30.00	0.40
3.70	30.00	30.30	30.00	0.30
4.00	30.10	30.40	30.00	0.30
4.50	29.90	30.20	30.00	0.30
6.00	30.10	30.40	30.00	0.30
6.50	30.30	30.60	30.00	0.30
7.00	30.30	30.60	30.00	0.30
7.50	30.40	30.70	30.00	0.30
8.00	30.20	30.50	30.00	0.30
9.00	30.30	30.50	30.00	0.20
10.00	30.30	30.50	30.00	0.20
11.00	30.20	30.40	30.00	0.20
12.00	30.20	30.50	30.00	0.30
13.00	30.30	30.50	30.00	0.20
14.00	30.40	30.60	30.00	0.20
15.00	30.20	30.40	30.00	0.20
16.00	30.10	30.30	30.00	0.20
17.00	30.20	30.40	30.00	0.20
18.00	30.20	30.40	30.00	0.20
19.00	30.20	30.40	30.00	0.20
20.00	30.20	30.40	30.00	0.20
21.00	30.20	30.40	30.00	0.20
23.00	30.00	30.30	30.00	0.30
24.00	29.80	30.00	30.00	0.20
25.00	29.80	30.00	30.00	0.20
26.00	30.10	30.20	30.00	0.10
28.00	29.70	29.90	30.00	0.20
29.00	29.90	30.10	30.00	0.20
30.00	29.90	30.10	30.00	0.20
31.00	30.10	30.30	30.00	0.20
32.00	30.30	30.50	30.00	0.20
33.00	30.20	30.40	30.00	0.20

VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL INTERIOR
DEL SILO DE 15 KG

R=9 CM H=54 CM L/D=3 D/DF=76-107

TIEMPO	TEMPERATURA (°C) @ Z=0.7			DELTA T
	PARED	CENTRO	T BANDO	CTO-PRD
0.00	20.00	20.00	33.00	0.00
5.10	26.90	25.83	33.00	-1.07
6.00	28.42	27.66	36.00	-0.76
7.00	31.04	30.41	32.00	-0.63
8.00	31.81	31.33	32.00	-0.48
9.00	32.46	32.14	32.50	-0.32
22.00	31.48	32.76	32.50	1.28
23.00	32.79	34.28	33.50	1.50
28.50	31.70	33.16	34.00	1.47
30.00	32.24	32.45	35.00	0.21
31.00	33.44	34.59	33.00	1.15
32.00	33.23	34.69	32.00	1.47
34.00	33.33	34.59	32.00	1.26
46.00	32.35	33.47	35.00	1.12
48.00	31.37	32.04	36.00	0.67
53.00	32.46	34.18	32.00	1.72
55.00	31.70	33.16	33.00	1.47
72.00	32.68	34.08	32.00	1.40
75.00	32.46	33.98	32.00	1.52

VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL INTERIOR
DEL SILO DE 40 KG

R=12.5 H=75 CM L/D=3 D/DF=63-105

TIEMPO	TEMPERATURA (°C) @ Z=0.8			DELTA T
	PARED	CENTRO	T BANDO	CTO-PRD
0.00	25.00	25.00	33.00	0.00
5.10	29.64	25.03	33.00	-4.61
6.00	30.50	26.28	36.00	-4.22
7.00	31.35	28.04	32.00	-3.31
8.00	31.56	28.77	32.00	-2.79
9.00	31.67	29.19	32.50	-2.49
22.00	33.27	32.61	32.50	-0.66
23.00	32.95	32.61	33.50	-0.34
28.50	32.31	32.30	34.00	-0.01
30.00	32.95	32.41	35.00	-0.55
31.00	33.38	33.45	33.00	0.07
32.00	33.38	33.34	32.00	-0.04
34.00	33.49	33.45	32.00	-0.04
46.00	33.59	33.13	35.00	-0.46
48.00	33.17	32.61	36.00	-0.55
53.00	33.17	33.24	32.00	0.07
55.00	32.74	32.41	33.00	-0.33
72.00	33.17	33.13	32.00	-0.03
75.00	33.06	33.03	32.00	-0.03

VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL INTERIOR
DEL SILO DE 40 KG DE YUCA FRESCA

R=12.5 CM H=75 CM L/D=3 D/DP=63-105

TIEMPO	TEMPERATURA (°C) @ Z=0.8			DELTA T
	PARED	CENTRO	T BANDO	CTO-PRD
0.00	20.00	20.00	33.00	0.00
4.50	25.84	20.42	33.00	-5.43
5.00	28.61	21.59	35.00	-7.02
6.00	29.11	22.50	33.00	-6.61
6.50	29.36	22.76	33.00	-6.61
20.00	33.01	31.85	33.00	-1.15
21.00	34.51	32.89	33.00	-1.62
22.00	35.27	33.41	32.00	-1.85
24.50	35.14	33.67	32.00	-1.47
25.50	35.52	33.80	33.50	-1.71
26.50	34.76	34.19	33.00	-0.57
27.00	35.02	33.93	33.00	-1.08
28.00	35.27	34.06	34.00	-1.20
29.00	35.27	34.06	34.00	-1.20
30.00	35.39	34.19	34.00	-1.20
44.00	34.39	34.71	33.00	0.33
45.00	34.76	34.71	32.00	-0.05
48.00	35.27	34.58	32.00	-0.68
49.00	35.02	34.58	32.00	-0.43
50.00	34.64	34.71	32.00	0.08
51.00	35.27	34.58	35.00	-0.68
52.00	34.64	34.45	33.50	-0.18
55.00	34.76	34.58	33.50	-0.18

VARIACION DE LA TEMPERATURA EN EL INTERIOR
DEL SILO DE 90 KG

R=27.5 CM H=35 CM L/D=0.6 D/DP>55

TIEMPO	TEMPERATURA (°C) @ Z=0.4			DELTA T
	PARED	CENTRO	T BANDO	CTO-PRD
0.00	20.00	20.00	31.20	0.00
5.00	29.04	20.41	28.90	-8.63
6.00	29.80	21.33	31.70	-8.47
7.00	30.69	21.72	31.50	-8.97
10.00	31.07	22.38	32.60	-8.69
11.00	31.44	23.29	31.00	-8.15
12.00	31.07	23.55	32.40	-7.51
13.00	31.57	24.34	32.70	-7.23
15.00	31.44	25.12	30.80	-6.32
19.00	31.82	27.09	31.70	-4.74
22.00	31.82	28.66	31.30	-3.17
24.00	31.70	29.05	30.80	-2.65
27.00	31.32	29.44	30.90	-1.88
29.00	31.57	29.97	30.80	-1.61
32.00	31.95	31.01	31.70	-0.94
53.00	31.70	32.71	31.70	1.02

TIEMPO	TEMPERATURA (°C) @ Z= 0.7			DELTA T
	PARED	CENTRO	T BANDO	CTO-PRD
0.00	20.00	20.00	31.20	0.00
5.00	28.65	20.54	28.90	-8.10
6.00	30.46	22.24	31.70	-8.21
7.00	31.42	22.90	31.50	-8.53
10.00	32.27	24.21	32.60	-8.06
11.00	32.63	24.73	31.00	-7.90
12.00	32.51	25.12	32.40	-7.39
13.00	32.63	25.78	32.70	-6.86
15.00	33.12	26.69	30.80	-6.42
19.00	33.36	28.13	31.70	-5.22
22.00	33.48	29.31	31.30	-4.17
24.00	33.36	30.10	30.80	-3.26
27.00	33.60	30.23	30.90	-3.37
29.00	33.24	30.62	30.80	-2.62
32.00	33.60	31.40	31.70	-2.20
53.00	33.72	32.97	31.70	-0.75

STATE OF CALIFORNIA
DEPARTMENT OF REVENUE
SALES TAX REPORT

DATE	AMOUNT	TAX	TOTAL
1-1-78	100.00	2.00	102.00
1-15-78	200.00	4.00	204.00
2-1-78	150.00	3.00	153.00
2-15-78	300.00	6.00	306.00
3-1-78	180.00	3.60	183.60
3-15-78	250.00	5.00	255.00
4-1-78	120.00	2.40	122.40
4-15-78	350.00	7.00	357.00
5-1-78	160.00	3.20	163.20
5-15-78	280.00	5.60	285.60
6-1-78	140.00	2.80	142.80
6-15-78	320.00	6.40	326.40
7-1-78	170.00	3.40	173.40
7-15-78	290.00	5.80	295.80
8-1-78	130.00	2.60	132.60
8-15-78	310.00	6.20	316.20
9-1-78	150.00	3.00	153.00
9-15-78	270.00	5.40	275.40
10-1-78	110.00	2.20	112.20
10-15-78	330.00	6.60	336.60
11-1-78	160.00	3.20	163.20
11-15-78	260.00	5.20	265.20
12-1-78	140.00	2.80	142.80
12-15-78	340.00	6.80	346.80
TOTAL	5000.00	100.00	5100.00

DATE	AMOUNT	TAX	TOTAL
1-1-79	120.00	2.40	122.40
1-15-79	280.00	5.60	285.60
2-1-79	150.00	3.00	153.00
2-15-79	320.00	6.40	326.40
3-1-79	180.00	3.60	183.60
3-15-79	250.00	5.00	255.00
4-1-79	110.00	2.20	112.20
4-15-79	300.00	6.00	306.00
5-1-79	160.00	3.20	163.20
5-15-79	270.00	5.40	275.40
6-1-79	130.00	2.60	132.60
6-15-79	310.00	6.20	316.20
7-1-79	170.00	3.40	173.40
7-15-79	290.00	5.80	295.80
8-1-79	140.00	2.80	142.80
8-15-79	330.00	6.60	336.60
9-1-79	150.00	3.00	153.00
9-15-79	260.00	5.20	265.20
10-1-79	110.00	2.20	112.20
10-15-79	340.00	6.80	346.80
11-1-79	160.00	3.20	163.20
11-15-79	240.00	4.80	244.80
12-1-79	120.00	2.40	122.40
12-15-79	360.00	7.20	367.20
TOTAL	5000.00	100.00	5100.00