

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

C. B. I.



Casa abierta al tiempo

ESTUDIO DEL EFECTO PROBIOTICO MEDIANTE EL MODELADO
MATEMATICO DEL CULTIVO DE *Megasphaera elsdenii*

**Tesis que para obtener el grado de
MAESTRO EN INGENIERIA QUIMICA**

Presenta:

NICOLAS OSCAR SOTO CRUZ

Ingeniero Bioquímico Industrial

Sustentada el 5 de noviembre de 1997 ante el jurado formado por:

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Presidente

Dr. Rafael Chávez Rivera

Secretario

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Vocal

Realizada en la Planta Piloto de Fermentación Sólida, UAM-1

A Dios

A mi amada Gloria

A mi pequeño Oscar

A mis Padres y Hermanos

*... Toda su vida estudió el universo,
pero nunca reparó en su mensaje más sencillo:
las criaturas pequeñas como nosotros sólo podemos soportar la inmensidad
por medio del amor*

CARL SAGAN, Contacto (1985)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, por su amistad, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por todo el apoyo para que este trabajo pudiera concluirse.

Al Dr. Rafael Chávez Rivera, por su muy acertada colaboración en la dirección de mi trabajo.

Al Dr. Leobardo Serrano Carreón, por su acertados comentarios y correcciones a mi trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca que hizo posible la realización de mis estudios de maestría.

A la Unión Europea por el financiamiento parcial de la tesis (proyecto: I.C.18*CT970185).

A todos los integrantes de la Planta Piloto de Fermentación Sólida de esta Universidad, por su amistad. Especialmente a Doña Maria Elena, Tania, Martha, Luciano y Juan Romano.

INDICE DEL CONTENIDO

1. Revisión de la literatura	1
1.1. Aspectos biológicos	2
1.1.1. Microorganismos y ecología del rumen	3
1.1.2. Condiciones fisicoquímicas del rumen	4
1.1.3. Protozoarios y hongos	6
1.1.4. Bacterias	7
1.1.5. Efecto probiótico y metabolismo ruminal	11
1.2. Aspectos de ingeniería	13
1.2.1. El rumen como reactor	13
1.2.2. Modelado matemático de sistemas biológicos	14
1.2.3. Modelos para sistemas biológicos de reacción	15
1.2.4. Modelo celular	19
1.2.5. Identificación y evaluación de parámetros	21
1.2.6. Métodos de resolución de los modelos	24
2. Justificación	26
3. Objetivos	29
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos particulares	30
4. Materiales y métodos	31
4.1. Microorganismo	32

4.2. Preparación de inóculo	32
4.3. Medio de cultivo	33
4.4. Sistema de fermentación	34
4.4.1. Cultivo por lote	34
4.4.2. Cultivo continuo	36
4.5. Tratamiento de muestras	37
4.6. Técnicas analíticas	38
4.6.1. Concentración de biomasa	38
4.6.2. Concentración de sustrato (ácido láctico)	39
4.6.3. Concentración de ácidos grasos volátiles	40
4.7. Estrategia experimental	40
4.8. Expresión de resultados	41
4.9. Simulación numérica del modelo y evaluación de parámetros	42
5. Desarrollo del modelo matemático	45
5.1. Descripción de las bases del modelo	46
5.2. Proposición de hipótesis de trabajo	48
5.3. Modelo para cultivo por lotes	49
5.4. Modelo para cultivo continuo	51
6. Resultados y discusiones	55
6.1. Modificación del medio de cultivo	56
6.1.1. Concentración de la fuente de carbono y energía	57
6.1.2. Concentración de la fuente de nitrógeno	58
6.2. Efecto del probiótico <i>Yea Sacc 1026</i> sobre el cultivo sumergido por lotes de <i>Megasphaera elsdenii</i>	59
6.2.1. Cinética de crecimiento	60
6.2.2. Cinética de consumo de sustrato	62
6.2.3. Cinética de formación de producto	65
6.3. Influencia de la concentración inicial de sustrato en el efecto del probiótico <i>Yea Sacc 1026</i> sobre el cultivo sumergido por lotes de <i>Megasphaera elsdenii</i>	69
6.3.1. Cinética de crecimiento	69
6.3.2. Cinética de consumo de sustrato	71
6.3.3. Cinética de formación de producto	73
6.4. Efecto de la edad del inóculo	76
6.2.1. Cinética de crecimiento	76
6.2.2. Cinética de consumo de sustrato	77
6.2.3. Cinética de formación de producto	79
7. Modelado matemático	81
7.1. El modelo	82
7.2. Ajuste de parámetros	86
7.3. Simulación de cinéticas	91
7.4. Cultivo continuo de <i>Megasphaera elsdenii</i>	95
7.5. Discusión sobre resultados globales	99

8. Conclusiones y perspectivas	103
Referencias bibliográficas	107
Apéndices	115
Apéndice 1. Nomenclatura	116
Apéndice 2. Gráficas de tiempo contra logaritmo natural de la concentración de biomasa, para la fase de muerte del cultivo	119
Apéndice 3. Gráficas de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato	122
Apéndice 4. Gráficas de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto	125
Apéndice 5. Gráficas de curvas de nivel para los ajustes de parámetros	128
Apéndice 6. Comparaciones de los datos experimentales contra las simulaciones numéricas	131

REVISION DE LA LITERATURA

1. REVISION DE LA LITERATURA

1.1. Aspectos biológicos

Los animales herbívoros dependen de los microorganismos presentes en su tracto digestivo, para realizar la digestión de las plantas que contienen polisacáridos complejos, ya que tales compuestos no son atacados por los enzimas de sus secreciones gástricas. Tales animales pueden ser divididos en monogástricos y poligástricos (rumiantes), la diferencia básica es que el estómago de los rumiantes está dividido en cuatro compartimentos con funciones especializadas y el de los monogástricos, como su nombre lo indica, no lo está. Los compartimentos del estómago de los rumiantes son: rumen, retículo, abomaso y omaso (Hobson, 1966), distribuidos como lo muestra la Figura 1.1.1. Dado que es en el rumen donde se lleva a cabo principalmente la degradación de los alimentos, es el objeto de interés para el presente trabajo.

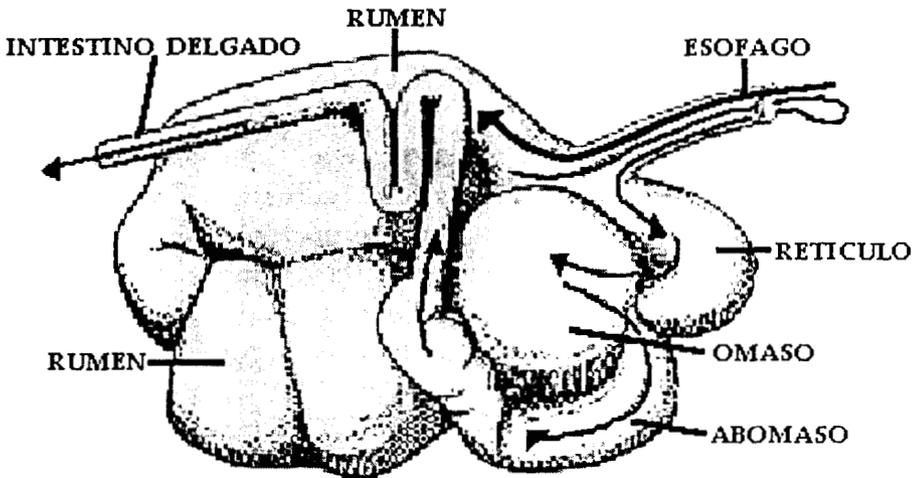


Fig. 1.1.1. Esquema de los órganos que forman el estómago del rumiante: rumen, retículo, omaso y abomaso.

En la Figura 1.1.1. puede apreciarse que el rumen es la porción más grande del estómago de los rumiantes. El esquema muestra, de manera simplificada, el flujo de los materiales a través del estómago.

1.1.1. Microorganismos y ecología del rumen

El rumen constituye aproximadamente el 65 a 70% del estómago de los rumiantes adultos, teniendo un volumen de 10 - 15 litros en la vaca y de aproximadamente 6 litros en una oveja (Brock *et al.*, 1987). Por otra parte, como ya se dijo, es principalmente en él donde se lleva a cabo la fermentación de los alimentos; que tiene por objeto transformar los sustratos no accesibles de las plantas (principalmente celulosa y otros polisacáridos complejos) en compuestos accesibles para la nutrición del rumiante (Hungate, 1966). En el rumen, los microorganismos son mezclados con el alimento por medio de contracciones y expansiones de la pared y por la rumia, así como por la gran secreción de saliva que posee el rumiante; todo ello ocasiona que el cultivo que se da en el rumen sea de tipo continuo, con un tiempo de residencia, en ovejas, de aproximadamente 1 día (Hobson, 1966). El rumen es esencialmente anaerobio aunque alguna cantidad de oxígeno puede llegar durante la ingestión y por medio de la sangre, a través de las paredes del mismo (Hobson, 1966).

Los microorganismos del rumen (como biomasa) proporcionan una proteína microbiana de alta calidad (Satter y Roffler, 1981), de gran importancia nutricional para el rumiante (Russell y Dombrowsky, 1980). La degradación de proteínas de la dieta por los microorganismos rumiantes produce péptidos y aminoácidos (Armstead y Ling, 1993). Aproximadamente el 60% de la proteína verdadera que se ingiere, es degradada por los microorganismos del rumen hasta amoníaco, una parte de éste va a la saliva y regresa por esta vía al rumen. El resto de la proteína que se ingiere pasa de largo por el rumen hasta el intestino delgado, donde se digiere y absorbe o es excretada por las heces, gracias a ello, los rumiantes utilizan el nitrógeno eficientemente (Satter y Roffler, 1981). En las secciones 1.1.2., 1.1.3. y 1.1.4., que se presentan a continuación, se discute sobre los microorganismos más importantes que se encuentran en el rumen, las interacciones entre ellos y con el medio ambiente.

1.1.2. Condiciones fisicoquímicas del rumen

El contenido del rumen incluye una fase gaseosa y una fase líquida, ambas prácticamente libres de oxígeno. Un análisis típico del gas del rumen es (Hobson, 1966):

Componente	(mg/L)
H ₂ S	0.13
H ₂	0.16
O ₂	7.56
N ₂	77.51
CH ₄	168.64
CO ₂	1130.82

Por su parte, el líquido es un caldo de cultivo pobre en aminoácidos, en el que la principal fuente de nitrógeno es el amoníaco. La fermentación produce ácidos que son en parte consumidos por el metabolismo bacteriano y en parte neutralizados por la saliva, resultando que, en condiciones normales, el pH del rumen es de 6 a 7 (Hobson, 1966). Investigaciones más recientes indican que el pH del rumen varía entre 5 y 7, siendo amortiguado por bicarbonatos, fosfatos, proteínas y ácidos grasos volátiles (Russell y Dombrowsky, 1980). Las dietas que incluyen gran cantidad de materiales amiláceos, propician que el pH descienda por debajo de 6, haciendo posible que predominen bacterias acidófilas (Hobson, 1966).

Los ácidos que se producen son, principalmente: fórmico, láctico y succínico, que luego son consumidos para producir acético, propiónico y butírico, estos últimos comúnmente conocidos, como ácidos grasos volátiles (AGV's); en concentraciones totales de aproximadamente 0.1 M (Hobson, 1966; Thomas y Rook, 1981). Del total de los AGV's, típicamente 65-74%mol es ácido acético, 15-20%mol es ácido propiónico y 8-16%mol es ácido butírico (Thomas y Rook, 1981). Además de los AGV's, se forma en primera instancia H₂, el cual puede ser consumido para formar metano. Un esquema simple de las reacciones que ocurren en el rumen es el siguiente:

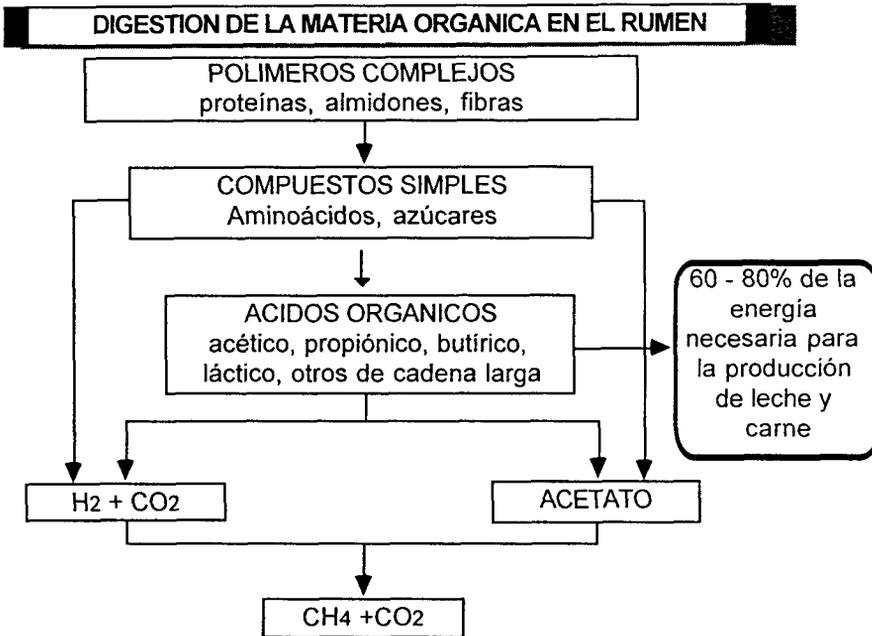


Fig. 1.1.2. Esquema condensado de la degradación de materia orgánica en el rumen.

Debido a que la fermentación es anaerobia, el poder reductor que se genera en exceso no puede combinarse con oxígeno para formar agua, de manera que los productos de la fermentación tienen que ser reducidos (Buttery, 1981). El producto de esta reducción es el metano y por consiguiente, su concentración varía con las variaciones de la concentración de AGV's, principalmente de ácido propiónico (Thomas y Rook, 1981).

Por otra parte, en cuanto al metabolismo del nitrógeno, éste tiene como principal fuente el amoníaco para las bacterias, mientras que algunos protozoarios (principalmente los ciliados) no pueden utilizarlo. Diversos estudios *in vitro*, indican que el nivel óptimo de amonio en el rumen es de 5×10^{-3} M (Buttery, 1981). En este ambiente, se desarrollan una gran variedad de microorganismos, entre protozoarios, hongos y bacterias, que interactúan activamente con el entorno (Hungate, 1966), que se describen brevemente a continuación.

1.1.3. Protozoarios y hongos

Los protozoarios del rumen están altamente adaptados a ese hábitat, son anaerobios, pueden fermentar materiales vegetales para obtener energía y almacenar polisacáridos (hasta un 82% de los azúcares asimilados pueden ser almacenados como almidón (Hungate, 1966). La mayoría de los protozoarios son ciliados, aunque se llegan a encontrar también flagelados y las cuentas típicas de ellos son del orden de 10^3 a 10^4 células/mL (Hungate, 1966) Investigaciones posteriores reportan cuentas de protozoarios ciliados de 4.3×10^5 células/g de contenido ruminal (Nagaraja *et al.*, 1992). La acidez es altamente dañina para los protozoarios, que se desarrollan en un rango de pH de 5.5 a 8.0, aunque lo hacen mejor a pH 6.5 (Hungate, 1966).

Los azúcares solubles son rápidamente asimilados por los protozoarios, por ejemplo, la sacarosa la utilizan más rápidamente que las bacterias, aunque no pueden utilizar la galactosa (Hungate, 1966). De la fermentación de los azúcares producen CO_2 , H_2 y ácidos volátiles. Son activamente proteolíticos y obtienen el nitrógeno principalmente de la ingestión de bacterias, aunque no existe especificidad por ingerir bacterias ruminales y también pueden, ingerir a otros protozoarios (Hungate, 1966). El ciliado *Dasytricha ruminantium* fermenta glucosa y otros azúcares solubles presentes en el fluido ruminal y produce ácido láctico (siendo este el más abundante de los productos, aunque en presencia de oxígeno lo consume), ácido acético, ácido butírico y CO_2 , además de trazas de ácido propiónico y ácido fórmico, almacenando amilopectina (Ellis *et al.*, 1991).

Los protozoarios contribuyen activamente a conservar el equilibrio del ecosistema ruminal, ya que por una parte consumen el escaso oxígeno que llega a encontrarse disuelto en el líquido ruminal (*D. ruminantium* y *Tritrichomonas foetus* lo consumen rápidamente), el cual es muy dañino para algunas bacterias, especialmente las metanógenas y las celulolíticas (Fonty *et al.*, 1987; Ellis *et al.*, 1991). A manera de ejemplo, puede citarse que la bacteria *Methanosarcina barkery*, que es un metanógeno, no se inhibió al incubarlo con los ciliados *Isotricha spp* y *D. ruminantium* aún en presencia de suficiente oxígeno en

la fase gas que mantendría una concentración en el líquido de 15.7 $\mu\text{mol/L}$ (Hilman *et al.*, 1988). Por otra parte, los protozoarios actúan como predadores de la población bacteriana (Nagaraja *et al.*, 1992). Se estima que los protozoarios en el rumen, consumen 90 g de bacterias diariamente, lo cual es comparable a un flujo de materia seca, a través del rumen, de 500 g/día (Fonty *et al.*, 1987). En presencia de protozoarios ciliados, la cuenta total de bacterias es de 2.8×10^{10} células/mL, mientras que en ausencia de ellos es de 1.3×10^{11} células/mL, con el efecto neto de un aumento en la concentración de AGV's y por lo tanto de disminución del pH (Nagaraja *et al.*, 1992).

Los hongos del rumen son anaerobios y se encuentran presentes en la flora ruminal después de 8 días del nacimiento, para el día 20 la cuenta llega ya a 10^2 a 10^3 esporas/mL. Los más frecuentes son *Neocallimastix frontales* y *Sphaeromonas communis* aunque con ciertas dietas los hongos tienden a desaparecer (Fonty *et al.*, 1987).

1.1.4. Bacterias

Las bacterias del rumen están adaptadas a vivir a valores de pH de 5.5 a 7.0, en ausencia de oxígeno y temperatura de 30 a 40°C (Hungate, 1966). La población bacteriana del rumen es muy variada e incluye bacterias celulolíticas, lactolíticas, metanógenas, entre otras (Fonty *et al.*, 1987). Algunas de las bacterias representativas que se encuentran comúnmente en el rumen son: *Oscilospira guillermondi*, *Bacillus merismopedioides*, *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Bacteroides succinogenes* (Hungate, 1966; Nagaraja *et al.*, 1992).

El tracto digestivo de los rumiantes, es rápidamente colonizado después del nacimiento por una amplia población bacteriana; después de dos días la cuenta de anaerobios estrictos llega a 10^9 bacterias/mL, a los cuatro días se presentan ya bacterias celulolíticas, las cuales son muy sensibles al oxígeno y cuyo principal exponente es *Ruminococcus* spp., cuyas cuentas pueden variar de 10^2 a 10^7 bacterias/mL (Fonty *et al.*, 1987).

El fluido ruminal contiene aproximadamente de 10^{10} a 10^{11} bacterias/mL, la gran mayoría de las cuales están en relación simbiótica unas con otras (Buttery, 1981). Unas proveen azúcares solubles a partir de los polisacáridos y otras, factores de crecimiento, como vitaminas (Buttery, 1981). El 40% de las bacterias ruminales utilizan el nitrógeno del amonio mientras que el 60% restante depende de otros suministros (Armstead y Ling, 1993). Las bacterias son metabólicamente más importantes que los protozoarios (Buttery, 1981). Las bacterias metanógenas, de las cuales el principal exponente es *Methanobacterium ruminantium*, crecen sólo cuando el potencial redox es bajo (-0.35 V) a pH 7 (Hungate, 1966). *M. ruminantium* es un coco Gram positivo que consume AGV's e hidrógeno (Hungate, 1966). Sin embargo, la metanogénesis se inhibe rápidamente en presencia de oxígeno en cantidades apenas detectables (<0.25 mol/L) (Hillman *et al.*, 1992). El tiempo de duplicación promedio de la mezcla de bacterias ruminales es de aproximadamente 6 horas (Armstead y Ling, 1993).

En el rumen habitan también bacterias proteolíticas, siendo las principales las de los géneros *Proteus*, *Corynebacterium* y *Micrococcus* (Hungate, 1966). Por otra parte, el principal microorganismo que degrada grasa es *Veillonella alcalenses*, obteniéndose como productos ácidos grasos (Hungate, 1966). *Butyrivibrio spp.* produce ácido butírico y puede usar hidrógeno para reducir ácido acético (Hungate, 1966).

La Figura 1.1.3., que se encuentra a continuación, muestra un esquema simplificado de las interacciones microbianas que se dan en el rumen.

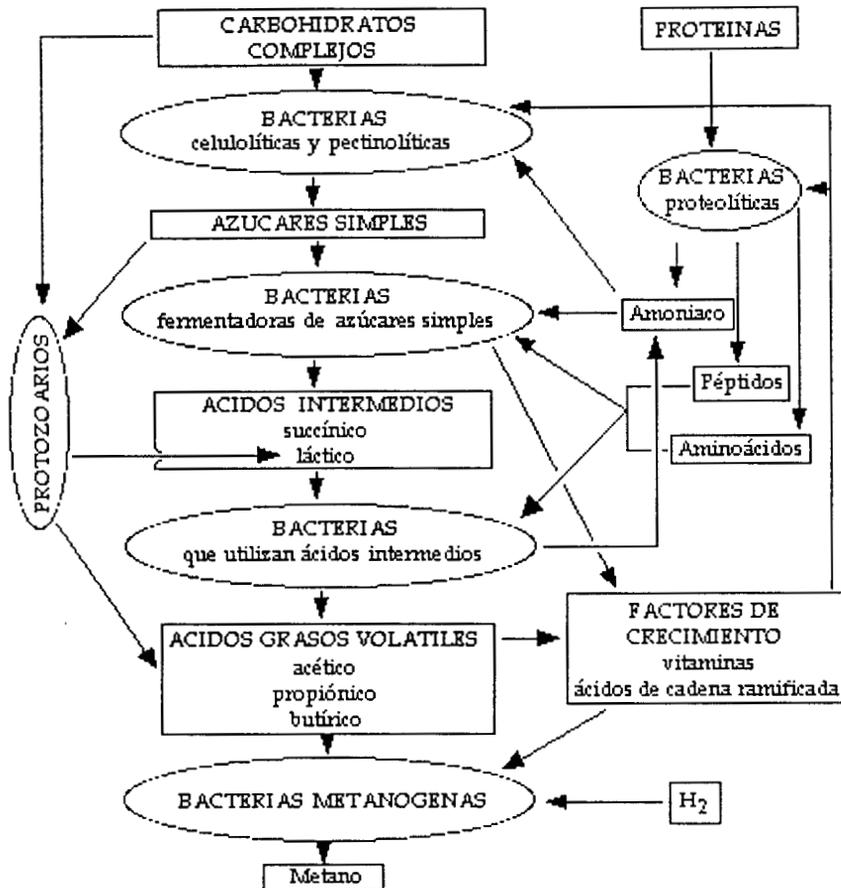


Fig. 1.1.3. Esquema simplificado de las interacciones microbianas que se dan en el ecosistema ruminal.

En el esquema anterior, se puede observar que en el ecosistema rumen se da una compleja relación microbiana; los productos de unos microorganismos son utilizados como sustratos o como factores de crecimiento por otros, los protozoarios además de participar en la degradación de los materiales presentes, actúan como predadores de la población bacteriana, las bacterias que utilizan los ácidos intermedios evitan su acumulación (sobre todo del láctico) con lo que evitan que el pH baje, lo cual es muy dañino para los protozoarios, etc.

De la gran población microbiana que se encuentra presente en el rumen, existen algunos microorganismos que sobresalen, ya sea por que representan una elevada proporción de la población total, o bien por el papel que desempeñan en el equilibrio del ecosistema rumen. De los protozoarios, el ciliado *Dasytricha ruminantium* es el más notable, por la elevada proporción en que se le encuentra, su capacidad para consumir oxígeno (conservando así las condiciones de anaerobiosis) y como predador de la población bacteriana (Nagaraja *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 1991). Por otra parte, dentro de la población bacteriana se destaca sobre todo *Selenomonas ruminantium*, ya que representa una elevada proporción de la cuenta total de bacterias, 16% según Latham (1971) o incluso del 22 - 51% según Caldwell y Bryant (1966). Además de *S. ruminantium* existe otra bacteria que por sus características también podría considerarse para su estudio, esta es *Megasphaera elsdenii*.

Megasphaera elsdenii es una bacteria ruminal Gram negativa encontrada en gran número de animales con dietas basadas en granos (Stewart y Bryant, 1988). Es la especie predominante que consume lactato en el rumen, siendo tal su capacidad de fermentarlo que llega a consumir hasta el 97% del lactato ruminal, para producir una mezcla de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Counotte *et al.*, 1981), e incluso se ha propuesto usarla para prevenir la acumulación de lactato en el rumen, ya que *in vitro* se pudo comprobar tal efecto (Kung y Hession, 1995).

Uno de los problemas más graves y frecuentes, encontrados en el rumen, es la acidosis láctica (Hungate, 1966; Nagaraja *et al.*, 1992; Kung y Hession, 1995). Kung y Hession (1995), definen la acidosis láctica como pH ruminal menor a 5.2 y concentración de ácido láctico mayor a 20 mM (aproximadamente 1.8 g/L). Este problema provoca serios trastornos en el sistema rumen, que van desde los leves, como diarrea, reducción de la salivación, reducción de la motilidad intestinal, redistribución del agua en el cuerpo, reducción en la eliminación de compuestos tóxicos, hasta la muerte del rumiante, ya que la gran mayoría de los microorganismos del rumen mueren (Slyter, 1976).

Hino y Kuroda (1993), basados en un estudio de los enzimas, sustratos, productos e intermediarios presentes, en cultivos de *Megasphaera elsdenii*, en glucosa y DL-lactato, proponen el siguiente esquema, como la posible vía metabólica para la conversión de lactato en ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico.

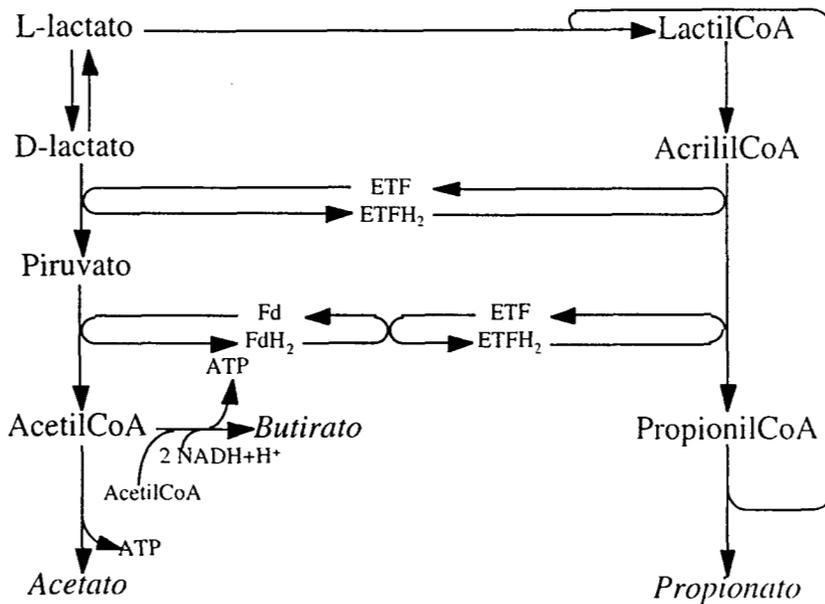


Fig.1.2. Esquema de la posible vía metabólica de utilización de lactato por *Megasphaera elsdenii*, para producir ácidos grasos volátiles.

Como puede verse en la figura anterior, la producción de ácidos grasos volátiles está ligada al metabolismo energético de *Megasphaera elsdenii*.

1.1.5. Efecto probiótico y metabolismo ruminal

En el sentido más amplio del término, los probióticos, para humanos y animales, son definidos como productos de fermentación, que contienen microorganismos específicos vivos y que proporcionados en la dieta como suplementos, promueven la estabilización de la microflora y el pH intestinal (Smith, 1991).

En nutrición de rumiantes, los probióticos son aditivos que incorporados en la dieta en proporciones pequeñas (1-3%), mejoran la producción de carne y leche (Hoyos, 1997; Saucedo-Castañeda *et al.*, 1997). El papel de los probióticos en la alimentación humana, es principalmente el restablecimiento de la microflora, mientras que en animales, se utilizan como aditivos para incrementar la digestibilidad de los alimentos y la producción de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, AGV's (Williams, 1991). En rumiantes, sus beneficios son los siguientes (Tapia, 1988; Hoyos, 1997):

- a) Estabilización del pH ruminal, a través del aumento de la concentración de bacterias que utilizan el ácido láctico.
- b) Aumento en el consumo de alimento, provocado por una mayor actividad de bacterias celulolíticas y mejor digestión de la fibra.
- c) Incremento de la producción de AGV's, utilizados por el rumiante como fuente de carbono y energía, promoviendo una mayor producción de leche.

En el contexto del presente trabajo, se entiende por probiótico a un aditivo que posee un efecto benéfico sobre el equilibrio del sistema microbiano del rumen, desempeñando, además de las funciones previamente mencionadas, la de estimular el crecimiento de ciertos microorganismos ruminales.

El estudio del mecanismo de acción de los probióticos, directamente sobre el rumen, puede ser muy complicado, dada la gran cantidad de microorganismos e interrelaciones que en él se dan; de manera que una simplificación razonable del problema, puede ser seleccionar un microorganismo que tenga un papel relevante, involucrado con el efecto probiótico. En este sentido, un buen candidato es *Megasphaera elsdenii*, ya que es el principal consumidor ruminal de ácido láctico, que al acumularse es responsable de la acidosis láctica. Por otra parte, los probióticos tienen incidencia sobre este problema.

1.2. Aspectos de ingeniería

El rumen es un sistema en el cual el alimento fresco se mezcla con la saliva y la masa fermentante, mientras el fluido y residuos de alimentación salen en cantidades equivalentes a las que se alimentan, es decir que, con algunas desviaciones, el rumen es un sistema que se comporta como un sistema de fermentación continuo (Hungate, 1966). De este modo, es posible formular balances de materia y energía, teniendo en cuenta que de 70 - 80% de la materia ingerida por el animal se utiliza en el rumen (Annison y Lewis, 1981).

1.2.1. El rumen como un reactor

Los flujos que pasan a través del rumen dependen de la especie de rumiante de que se trate y por supuesto de la edad, de este modo, en vacas adultas, el flujo de materia seca a través del rumen es de aproximadamente 10.5 Kg/día, los cuales van acompañados por un flujo de saliva de aproximadamente 80 L/día (Wilson y Brigstocke, 1987; Taniguchi *et al.*, 1995); mientras que en la cría que ha comenzado a ingerir alimentos sólidos el flujo de materia seca es de 2.8 Kg/día con un flujo de saliva de aproximadamente 39 L/día (Taniguchi *et al.*, 1995). De manera similar, en el rumen de las ovejas el flujo de materia seca es de 5.8 Kg/día (Hungate, 1966), acompañados de aproximadamente 10 L/día de saliva (Taniguchi *et al.*, 1995); de este modo, ya que la cantidad de materia seca que se encuentra regularmente en el rumen es de 4.4 Kg, se puede estimar la tasa de dilución en ovejas como $(5.8 \text{ Kg/día}) / (4.4 \text{ Kg}) = 1.309 \text{ día}^{-1}$ (Hungate, 1966). Es decir, aproximadamente 18 horas de tiempo de residencia promedio.

En cuanto al flujo de energía, el flujo total debido a los ácidos grasos volátiles (absorbidos por el rumiante) es de 3530 Kcal/día, mientras que la energía total (lo cual incluye AGV's, glucosa, lactato, etc.) absorbida es de 9209 Kcal/día (Taniguchi *et al.*, 1995).

De toda la energía que se "libera" durante la fermentación, 75-88% la absorbe el rumiante como AGV's, 9-18% se pierde por eructación en forma de metano y 3-7% se pierde como calor (Thomas y Rook, 1981).

Las desviaciones más importantes, con respecto al comportamiento de un fermentador continuo, son las siguientes (Hungate, 1966):

- 1) El rumiante no consume alimento de manera continua
- 2) El volumen del rumen no es constante
- 3) La tasa de salivación no es constante
- 4) La tasa a la cual los materiales fermentados salen del rumen tampoco es constante y
- 5) La rumia altera el sentido del flujo de materiales

Sin embargo, si el tiempo de observación es de aproximadamente 1 día, se pueden despreciar tales desviaciones, como de hecho se ha realizado, y tomando valores promedio, se puede estudiar al rumen como un fermentador continuo.

1.2.2. Modelado matemático de sistemas biológicos

Un modelo se puede definir como una aproximación física o abstracta, que pretende representar un fenómeno que ocurre en la naturaleza (Gutiérrez-Rojas, 1995). Es un sistema de ecuaciones, que representan al sistema bajo estudio. Los modelos simples pueden ser algebraicos, pero son más frecuentes las ecuaciones diferenciales, sobre todo cuando son esenciales las descripciones dinámicas (Perlmutter, 1972).

En física se usan dos tipos de aproximaciones para describir fenómenos: la descripción corpuscular y la descripción continua. En la corpuscular, se ve al sistema como compuesto de un gran número de unidades elementales, debiéndose conocer las propiedades básicas de ellas y sus interacciones; el sistema se analiza con los métodos de la mecánica estadística, para calcular las propiedades del sistema. Esta descripción es extremadamente versátil, pero además de los requerimientos antes mencionados, se debe utilizar una herramienta matemática muy elaborada (Roels, 1980).

La aproximación del continuo es más usual en estudios de ingeniería y es la base del llamado método macroscópico. Se basa en la definición de variables macroscópicas (temperatura, presión, concentración, entre otras), que se suponen continuas con respecto al tiempo y a las coordenadas espaciales, ignorándose la estructura corpuscular subyacente al sistema (Roels, 1980; Roels, 1982).

Entre las razones para llevar a cabo el modelamiento de sistemas biológicos y bioreactores, Munack (1985) y Belgardt (1991) apuntan que una herramienta fundamental en el diseño y control de procesos biotecnológicos es el modelamiento del sistema. Gutiérrez-Rojas (1995) menciona que en la medida en que se conozca más sobre los fenómenos detallados, que caracterizan a los cultivos biológicos, será posible el diseño y control de los bioreactores en cualquier escala de operación y la posibilidad de aplicación será mayor.

La utilización de modelos matemáticos constituye una útil herramienta en tanto que (Trambouze, 1979):

- 1) Facilitan el estudio de uno o varios fenómenos, por separado o en su conjunto.
- 2) Complementan los conocimientos de un fenómeno situándolo en un contexto más general.
- 3) Permiten predecir resultados bajo condiciones de operación diferentes a las experimentadas.
- 4) Permiten establecer estrategias globales para el escalamiento y el control.

1.2.3. Modelos para sistemas biológicos de reacción

Los procesos de fermentación, son caracterizados por el crecimiento de una población de microorganismos, que degradan un sustrato, formando algún(os) producto(s). El modelo físico de los procesos es usualmente descrito por un arreglo de ecuaciones algebraicas y/o diferenciales, derivadas de balances y que involucran el modelamiento de la tasa de crecimiento (Maher *et al.*, 1995).

Los modelos matemáticos en biotecnología pueden ser desarrollados en diferentes niveles, a saber (Schügerl, 1985):

- 1) Nivel molecular o enzimático (modelos de síntesis enzimática).
- 2) Nivel de componentes intracelulares (modelos celulares estructurados).
- 3) Nivel celular (modelos cinéticos).
- 4) Nivel celular - medioambiente (modelos no estructurados para reactores).
- 5) Nivel dinámico-celular - medioambiente (modelos estructurados para reactores).

La historia de los modelos matemáticos de procesos biotecnológicos, comienza con las famosas ecuaciones de:

$$\begin{aligned} \mu &= \frac{\mu_{\max}}{2} \frac{S}{K} & \text{si } S < 2K \\ \mu &= \mu_{\max} & \text{si } S \geq 2K \end{aligned} \quad \text{Blackman (1905)}$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad \text{Monod (1942)}$$

$$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-hS}) \quad \text{Teissier (1942)}$$

las cuales relacionan la concentración de sustrato limitante con la tasa de crecimiento de los microorganismos.

La construcción de un modelo matemático que permita predecir el comportamiento de las variables que definen el estado del sistema, debe partir de conceptos bien formulados y adecuadamente estructurados; los modelos matemáticos se constituyen de un conjunto de ecuaciones, cada una definida para cada variable de estado, las ecuaciones se obtienen a partir de (Gutiérrez-Rojas, 1995):

- 1) Balances de materia y energía.
- 2) Relaciones cinéticas.
- 3) Relaciones fenomenológicas.
- 4) Resultados empíricos restringidos a ciertas condiciones.

Las ecuaciones siempre contienen constantes o parámetros que dependen de las condiciones bajo las que se desarrolla la experimentación (Gutiérrez-Rojas, 1995); de hecho, un paso más en el modelamiento es la evaluación de los parámetros desconocidos del sistema, los cuales pueden ser físicos, químicos y biológicos (Munack, 1985). Un prerrequisito para el desarrollo de tales modelos, es un análisis del sistema basado en datos experimentales de suficiente cantidad y calidad (Schügerl, 1985). Esto quiere decir, que en la medida en que se cuente con datos experimentales, se podrá medir algunos de los parámetros del modelo con suficiente confianza para fijar su valor, lo cual reducirá en un menor número de parámetros a ser ajustados. Aunado a lo anterior, un análisis detallado de los datos experimentales, puede sugerir adiciones o restricciones en las ecuaciones, lo cual permitirá obtener un modelo que represente una mejor aproximación, al fenómeno físico bajo estudio.

La formulación de un modelo matemático debe cubrir de manera sistemática las siguientes etapas (Luyben, 1973):

- 1) **Descripción de las bases del modelo.** En esta etapa se definen tanto el sistema como las variables físicas, químicas y biológicas que participan. Entonces es necesario seguir su curso (entradas, salidas, consumo), mediante balances globales totales y parciales para cada especie. En la descripción de la dinámica del sistema dos tipos de información son necesarios: la cinética del transporte de sustancias al lugar de reacción y la cinética de la reacción en sí; reuniendo estos elementos se obtiene el modelo macrocinético del comportamiento del sistema (Roels, 1982).
- 2) **Proposición de hipótesis de trabajo.** Son consideraciones que pretenden simplificar la complejidad del modelo, con base en observaciones experimentales. Con frecuencia se introducen grupos adimensionales que tienen un claro significado físico, útil en la comprensión del problema y que facilitan su solución. Entre las hipótesis más frecuentes, a que se recurre al modelar sistemas biológicos, es la de considerar a la biomasa como compuesta por células idénticas, todas con el mismo estado fisiológico (Crundwell, 1994).
- 3) **Análisis de consistencia del modelo.** Se debe asegurar que se dispone de al menos el mismo número de ecuaciones que de variables y que el sistema es consistente desde un punto de vista dimensional.
- 4) **Solución de las ecuaciones del modelo.** Si es posible resolver de manera analítica, se obtiene soluciones exactas, pero si la solución es numérica se obtienen valores aproximados.
- 5) **Verificación.** Se deben confrontar las predicciones del modelo, con resultados experimentales propios. En la mayoría de los casos, esta

es la etapa crítica, ya que sólo ciertos parámetros, y variables de estado, son medibles directamente, mientras que otras se deben estimar. Un cuello de botella del desarrollo de modelos, son las técnicas de medición inadecuadas, por ejemplo, para el desarrollo de modelos dinámicos se requiere de análisis en línea del sistema (Schügerl, 1985).

En los procesos biológicos, durante el crecimiento nueva masa celular es formada, autocatalíticamente, a partir del sustrato a una cierta tasa específica de crecimiento (μ), la cual constituye el modelo celular, que se discute en la siguiente sección.

1.2.4. Modelo celular

Una fase importante en la construcción de modelos matemáticos para sistemas biológicos, es identificar una expresión adecuada para la tasa de crecimiento de la biomasa, ya que ello constituye en sí un modelo y, de hecho, una buena práctica es mantener el modelo celular tan simple como sea posible, ya que los problemas de identificación de parámetros y verificación del modelo, se incrementan rápidamente con la complejidad del mismo (Bellgardt, 1991). Una de las principales premisas, en el desarrollo de muchos modelos de crecimiento de microorganismos, es identificar un sustrato "limitante del crecimiento", en términos del cual se expresa comunmente la tasa de crecimiento micobiano (Blanch, 1981).

Los modelos de crecimiento celular pueden dividirse en estructurados y no estructurados (Bellgardt, 1991; Blanch y Clark, 1994). Los modelos no estructurados son los más simples y en ellos se toma a la biomasa como un material uniforme (en solución), sin dinámica interna cuyas tasas de reacción sólo dependen de las condiciones en la fase líquida del reactor; es decir, sólo se toman promedios sobre la población, de tal manera que los modelos no estructurados sólo contienen cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto, lo cual acota el potencial descriptivo de este tipo de modelos celulares (Bellgardt, 1991).

Un modelo no estructurado para el crecimiento de la biomasa es una buena aproximación, si los tiempos de respuesta de la célula a los cambios del medio ambiente son despreciables, comparados con la duración del proceso de fermentación (Bellgardt, 1991).

Si se incluyen en el modelo celular efectos como regulación metabólica, concentraciones internas de metabolitos, enzimas o ARN; es decir si se incluye el estado interno de las células y sus cambios, se tiene un modelo estructurado (Bellgardt, 1991; Blanch y Clark, 1994).

En los modelos no estructurados, las reacciones biológicas dependen directa, y solamente, de variables macroscópicas que describen las condiciones en el fermentador, siendo la concentración de la masa celular, el único estado biológico variable (Bellgardt, 1991). Esto es particularmente útil en casos complejos, donde un modelo no estructurado es mucho más simple y fácil de aplicar en la práctica (Amrane y Prigent, 1994).

Debido a la omisión extensiva del metabolismo celular, este tipo de cinéticas pueden ser tomadas como cinéticas formales, que sólo hacen una descripción integral del proceso, sin una descripción detallada de los mecanismos subyacentes (degradación de sustratos, síntesis de componentes celulares, duplicación de ADN); este tipo de modelos celulares, solo fallan cuando es indispensable que la dinámica intracelular sea considerada (Bellgardt, 1991).

Usualmente, las reacciones microbianas alcanzan su tasa específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) a altas concentraciones de sustrato limitante. Por otro lado, la tasa de reacción es cero si no hay sustrato limitante disponible. De manera que la expresión para la tasa específica de crecimiento, en su forma más simple, puede escribirse como el producto de la tasa específica máxima de crecimiento por una función (τ), que depende de la concentración de sustrato limitante (S) (Bellgardt, 1991):

$$\mu(S) = \mu_{\max} \tau(S) \quad (2.4-1)$$

Las cinéticas dependientes de sustrato simples son las más comunes y sencillas, sin embargo en algunos casos son inadecuadas, por lo cual se han desarrollado otros tipos de cinéticas para modelos no estructurados a nivel de población, a saber (Bellgardt, 1991):

- 1) Cinéticas de crecimiento simple y consumo de sustrato.
- 2) Cinéticas de crecimiento independientes del sustrato.
- 3) Cinéticas de inhibición por sustrato y producto.
- 4) Cinéticas de sustratos esenciales.
- 5) Cinéticas de mejoramiento de crecimiento y sustratos alternativos.
- 6) Combinaciones de sustratos esenciales y alternativos.

1.2.5. Identificación y evaluación de parámetros

El modelado matemático, incluye no sólo la selección de la estructura correcta del modelo, sino también la determinación cuantitativa de los parámetros del mismo (Bellgardt, 1991).

Los parámetros relacionados con la biomasa, poseen particular importancia en el contexto del modelado de sistemas biológicos, ya que aportan información valiosa para la comprensión del fenómeno bajo estudio. Los parámetros que se encuentren presentes dependen del tipo de modelo y del tipo de expresión para el modelo celular, que se esté utilizando, sin embargo, los más frecuentes son:

- a) La tasa específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), que representa un límite al incremento de la tasa específica de crecimiento debidos a aumentos de la concentración de sustrato (Monod, 1949). Este parámetro, depende de las condiciones bajo las cuales se cultive a

los microorganismos, sustrato limitante, pH, temperatura, tasa de mezclado, presión salinidad, etc. Depende también de algunos otros factores como el tipo de fuente de nitrógeno que se utilice (Bader, 1982).

- b) La constante de saturación o constante de afinidad (K_s), la cual es una medida de la afinidad del microorganismo por el sustrato limitante (a menor valor numérico de K_s , mayor afinidad del microorganismo por el sustrato). Es la concentración de sustrato limitante, a la cual se obtiene una tasa específica de crecimiento igual a un medio de la máxima (Monod, 1949)
- c) El coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato limitante ($Y_{X/S}$), que es una medida de la fracción de sustrato limitante transformado a biomasa y su inverso ($1/Y_{X/S}$), representa la masa de sustrato limitante utilizado en la formación de una unidad de biomasa (Monod, 1949).

Como una ilustración, para el caso de *Megasphaera elsdenii*, se presenta la siguiente tabla que muestra la constante de afinidad (K_s) y tasa específica de crecimiento máxima (μ_{max}) para diversos sustratos:

Tabla 2.1. Parámetros de la ecuación de Monod para *Megasphaera elsdenii*, cultivada en diferentes sustratos.

Sustrato	μ_{max} (h^{-1}) ^a	K_s (mM) ^b
Glucosa	0.45	0.11
Maltosa	0.55	1.34
Acido láctico	0.21	0.37

a) Russell y Baldwin (1978). b) Russell y Baldwin (1979).

En la Tabla 2.1., se puede ver que *M. elsdenii* presenta un crecimiento mejor con glucosa y maltosa que con ácido láctico, ya que la tasa específica máxima de crecimiento es mayor con estos sustratos. Por otra parte, la afinidad de *M. elsdenii* es mayor por la glucosa (recuerdese que a menor valor numérico de K_s , mayor afinidad del microorganismo por el sustrato), después por el ácido

lático y es mucho menor por la maltosa, debido probablemente a la necesidad de romper el dímero en sus dos monómeros de glucosa.

Por otra parte, la determinación de los valores numéricos de los parámetros del modelo, puede seguir dos rutas. La más conveniente es estimar los parámetros del modelo, a partir de varios experimentos independientes (Bellgardt, 1991; Crundwel, 1994). Si lo anterior no es posible, entonces deben ser determinados por ajuste del modelo a los datos experimentales, de hecho esta es la manera más usual, se adopta una estructura analítica particular y se ajustan los parámetros, mediante el uso de técnicas numéricas (Bellgardt, 1991; Maher *et al.*, 1995). Los algoritmos más utilizados, en el ajuste de parámetros, son los métodos de Newton y de Marquardt (Howell, 1983).

Para el ajuste de parámetros, se selecciona una función objetivo de manera que pequeños valores de ella, representen una buena aproximación de las predicciones del modelo, a los datos experimentales. Los parámetros del modelo, son entonces ajustados, alcanzando un mínimo en la función objetivo, obteniéndose *los parámetros del mejor ajuste*. Es importante señalar, que los datos experimentales están sujetos a errores de medición, de manera que el modelo casi nunca ajusta exactamente, aunque este sea correcto (Press *et al.*, 1990).

Entre las funciones objetivo se encuentran las siguientes:

a) El índice de desempeño (J), definido como (Starzak *et al.*, 1994):

$$J \equiv \sum_{i=1}^N \left[\frac{Y_{i,obs} - Y_{i,cal}}{Y_{i,max}} \right]^2 \quad (2.5.-1)$$

la cual suma los cuadrados resultantes de comparar las mediciones experimentales, $Y_{i,obs}$, con las predicciones proporcionadas por el modelo, $Y_{i,cal}$, normalizando la diferencia, al referirlas al valor máximo experimental $Y_{i,max}$ correspondiente.

b) La función "chi-cuadrada" (χ^2), definida como (Press *et al.*, 1990):

$$\chi^2 \equiv \sum_{i=1}^N \left[\frac{Y_{i,obs} - Y_{i,cal}}{\sigma_i} \right]^2 \quad (2.5.-1)$$

la cual suma los cuadrados resultantes de comparar las mediciones experimentales, $Y_{i,obs}$, con las predicciones proporcionadas por el modelo, $Y_{i,cal}$, referidas al valor de la varianza experimental, σ_i , para el par de datos (X_i, Y_i) correspondiente.

1.2.6. Métodos de resolución de los modelos

Una vez que el modelo ha sido adecuadamente formulado, se debe proceder a resolverlo para obtener predicciones, que pueden ser comparadas con los datos experimentales de que se disponga. Dependiendo de la complejidad del modelo, se proponen soluciones analíticas o soluciones numéricas. El encontrar solución analítica a un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) o parciales (EDP), depende de varios factores (Lapidus, 1962). Por ejemplo, cuando se trata de EDO, para una variable independiente x y una variable dependiente $y = y(x)$ la forma implícita de una EDO de n -ésimo orden puede ser escrita como:

$$F(x, y, y^{[1]}, y^{[2]}, \dots, y^{[n]}) = 0 \quad (2.6.-1)$$

Donde $y^{[r]} = d^r y / dx^r$. En forma explícita esta ecuación toma la forma:

$$y^{[n]} + g_1 y^{[n-1]} + g_2 y^{[n-2]} + \dots + g_n y = p(x, y) \quad (2.6.-2)$$

Donde los coeficientes g_i son constantes y/o funciones de x y y . La posibilidad de encontrar solución analítica es muy dependiente de la naturaleza de los coeficientes g_1, g_2, \dots, g_n y del término, no homogéneo, p ; cuando los coeficientes g_i son constantes, una solución analítica siempre puede obtenerse. Cuando son funciones de x , es usualmente posible obtener una solución analítica, por otra parte, cuando algunos de los coeficientes g_i y p son funciones de y la ecuación es no lineal y, una solución analítica explícita es casi

imposible de obtener, en tales casos la solución numérica es la alternativa (Lapidus, 1962).

Para el caso de sistemas de EDO, se utilizan varias metodologías. Los métodos de Runge-Kutta para sistemas de EDO (Press *et al.*, 1990), son de los más frecuentemente utilizados. Por otra parte, Flora *et al.* (1995) usaron, también para sistemas de EDO de primer orden, el método de Gear. Así mismo, se ha utilizado software ya desarrollado como el D02BBF de la librería de NAG FORTRAN (Numerical Algorithms Group, Downer Grovo, IL), que integra EDO de primer orden usando el método de Runge-Kutta (Cachon *et al.*, 1995).

Los métodos que se utilizan para resolver sistemas de ecuaciones diferenciales parciales (EDP) son más complejos que los que se usan para las EDO. Gutiérrez-Rojas (1995) utilizó el método de diferencias finitas para resolver un sistema de EDP, mientras que Cachon *et al.* (1995) informan que es posible utilizar el software D03PBF de la librería de NAG FORTRAN, que integra EDP usando el método de Gear.

JUSTIFICACION

2. JUSTIFICACION

De acuerdo a lo expuesto, es posible observar que la porción de estómago de los rumiantes conocido como rumen, se asemeja en su funcionamiento a un fermentador. Es decir, se trata de un recipiente en el que se llevan a cabo reacciones químicas, catalizadas por una amplia y compleja gama de microorganismos, que son de capital importancia para la nutrición del rumiante. De esta manera, el estudio de tal sistema cae dentro del campo de interés de la ingeniería química, pues sus herramientas pueden ser aplicadas a él. Una de tales herramientas es el modelado matemático del sistema que, como ya se mencionaba anteriormente, proporciona un mejor conocimiento de los fenómenos que ocurren y posibilita un mejor manejo del sistema en la práctica.

Un fenómeno de gran importancia, es el denominado efecto probiótico; ya que uno de los problemas que previene, la acidosis láctica, es frecuente y grave. Se sabe que los probióticos proporcionan efectos benéficos al sistema microbiano del rumen, entre los que se encuentra, la estimulación de la microflora que consume ácido láctico, sin embargo, no se conoce de que manera estimula a los microorganismos consumidores de ácido láctico.

Como se mencionó anteriormente, el estudio del mecanismo de acción de los probióticos, directamente sobre el rumen, puede ser muy complicado, dada la gran cantidad de microorganismos e interrelaciones que en él se dan. Una simplificación razonable del problema, puede ser seleccionar un microorganismo que tenga un papel relevante, involucrado con el efecto probiótico, y utilizarlo como modelo de estudio. Un buen candidato es *Megasphaera elsdenii*, ya que es el principal consumidor ruminal de ácido láctico, que al acumularse es responsable de la acidosis láctica, problema en el que los probióticos tienen incidencia.

De esta forma, se propone el presente trabajo, una vez revisados los aspectos biológicos y de ingeniería relacionados, para contribuir a esclarecer el mecanismo del efecto probiótico, en rumiantes.

En concreto, la proposición es estudiar el efecto de un probiótico comercial, sobre cultivos axénicos por lotes (sin y con probiótico), de la bacteria ruminal

Megasphaera elsdenii, utilizando el modelado matemático, como herramienta de estudio. La intención es detectar los cambios en los parámetros de cultivo, provocados por la presencia del probiótico en el medio.

Una cuestión importante, que viene a reforzar la justificación, es el haber detectado en la literatura, una cierta ausencia en cuanto a modelos matemáticos, para sistemas con este tipo de microorganismos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Contribuir al estudio del efecto probiótico en rumiantes, mediante la formulación y resolución de un modelo matemático para cultivo sumergido por lotes, utilizando la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*, como modelo experimental.

3.2. Objetivos particulares

- 3.2.1. Evaluar el efecto del probiótico comercial *Yen Sacc 1026* sobre la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*, mediante cultivos por lote sin y con probiótico.
- 3.2.2. Formular un modelo matemático para el cultivo sumergido por lote, de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*.
- 3.2.3. Resolver el modelo matemático y evaluar los parámetros del mismo, mediante la comparación con los datos experimentales.
- 3.2.4. Proponer, mediante el análisis global de los resultados, una explicación del beneficio que recibe el rumiante con la adición de un probiótico.

MATERIALES Y METODOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Microorganismo

Se utilizó la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* cepa 390, donada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa se conservó a -20°C , en frascos serológicos de 10 mL, conteniendo 5 mL de glicerol al 40%, preparados en anaerobiosis.

4.2. Preparación de inóculo

a) *Inóculo fresco para cinética por lote.* Las células que se encuentran conservadas, se reactivaron mediante el proceso que se describe a continuación. El contenido total del frasco serológico (5 mL), se transfiere a un frasco serológico de 120 mL que contiene 45 mL deL medio de cultivo descrito en la sección 4.3., en condiciones anaerobias y asépticas. Se incuba a 37°C en agitación a 200 rpm, durante 24 h. De este frasco se toman 5 mL y se transfieren a un frasco idéntico, el cual se incuba a las mismas condiciones, durante 12 h. Se repite el procedimiento anterior, incubándose durante 8 h. Este último cultivo, se utiliza inmediatamente en los ensayos.

b) *Inóculo viejo para cinética por lote.* Se desarrolla el inóculo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. El inóculo así desarrollado se mantiene en refrigeración, a una temperatura de 4°C durante 15 días y, después de esto se utiliza.

c) *Inóculo fresco para cultivo continuo.* Para este caso se llevan a cabo los dos primeros pasos del inciso a, del frasco incubado 12 h se transfieren 25 mL a un frasco serológico de 500 mL, que contiene 225 mL de medio estéril y anaerobio; se incuba a 37°C en agitación a 200 rpm, durante 8 h, utilizándose su contenido íntegro como inóculo para el reactor de dos litros.

4.3. Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo con el que se realizaron las fermentaciones es la siguiente:

Acido láctico	10.00 g
Peptona de caseína	8.00 g
Extracto de carne	2.80 g
Extracto de levadura	2.80 g
Clorhidrato de cisteína	0.50 g
Tween 80	1.00 mL
Solución de resarzurina (0.1%)	1.00 mL
Solución de sales	40.00 mL
Agua desionizada c.b.p.	1000 mL

Solución de sales:

Fosfato dibásico de potasio	1.5 g
Sulfato de amonio	3.0 g
Cloruro de sodio	3.0 g
Sulfato de magnesio	0.3 g
Cloruro de calcio	0.3 g
Fosfato monobásico de potasio	1.5 g
Agua desionizada	1000 mL

Se pesan y mezclan todos los componentes, se adiciona el agua desionizada, se disuelve y ebulle durante 10 minutos. Posteriormente se burbujea CO_2 (100 mL/minuto) durante 15 minutos para remover el oxígeno, se adiciona NaOH 8N para ajustar el pH a 8.0. Una vez ajustado el pH, se cambia a una corriente de N_2 , que se mantiene dentro del matraz sin burbujear, para preservar la anaerobiosis y el pH. Se sella el frasco. Se esteriliza en autoclave a 15 lb_f/pulg² durante 15 minutos. El color del medio debe ser amarillo claro o incoloro, lo cual indica anaerobiosis, color rosa indica presencia de oxígeno.

Cuando se preparó medio de cultivo con probiótico, se procedió de la siguiente manera. Se pesaron 4 g de probiótico (*Yea Sacc 1026*), se adicionan 50 mL de agua desionizada y se agita durante una hora. Después de esto, se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos, la solución sobrenadante se filtra primero en papel Whatman #42 y después en membrana de 0.45 μm de tamaño de poro. Paralelamente se esteriliza una membrana igual y un frasco serológico de 10 mL sellado, al que se le ha cambiado el aire por una atmósfera de CO_2 . Se filtra la solución, a través de la membrana estéril utilizando una jeringa desechable de 10 mL, descargando el filtrado dentro del frasco. Del frasco se toma en condiciones estériles y anaerobias, el volumen necesario para que en el medio se tenga una concentración de 2% V/V, y se transfiere al frasco con medio de cultivo, preparado según la técnica previamente descrita.

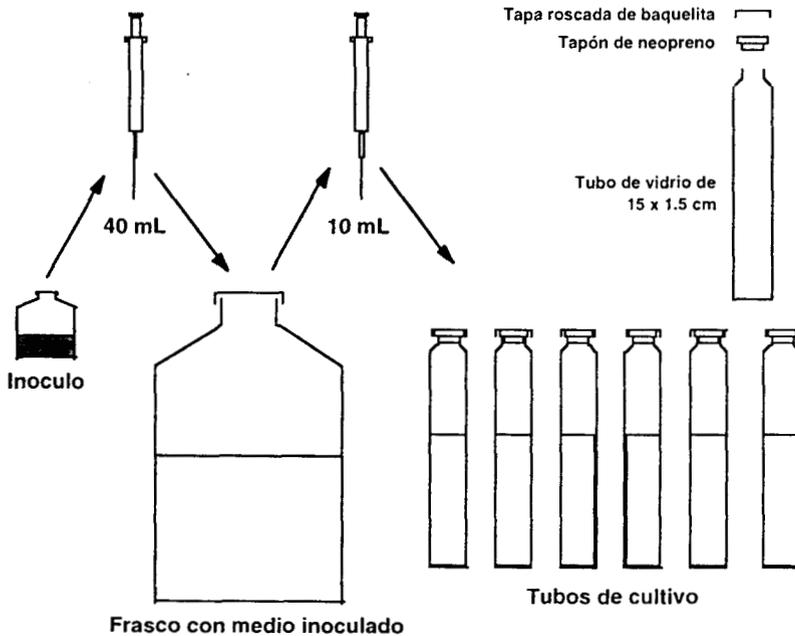
Para la preparación del medio de cultivo en el reactor, se pesan y mezclan todos los componentes (excepto la resazurina), se adiciona el agua desionizada, se disuelve y ebulle durante 10 minutos. Se adiciona la solución al reactor, se coloca la tapa y se esteriliza en autoclave a 15 $\text{lb}_f/\text{pulg}^2$ durante una hora. Se deja enfriar y se hace pasar una corriente de nitrógeno, previamente filtrada en filtro microbiológico estéril, hasta alcanzar condiciones de anaerobiosis, que se determina cuando la lectura de un electrodo de oxígeno disuelto, indica cero.

4.4. Sistema de fermentación

4.4.1. Cultivo por lote

El sistema de fermentación, para cultivo por lotes, son tubos de vidrio de 1.5 cm de diámetro por 15 cm de longitud, provistos con tapón roscado de baquelita. El tapón es horadado y antes de enroscarlo, se coloca un tapón de neopreno para un sellado perfecto, que permite introducir o extraer fluidos de su interior, por medio de jeringa estéril, sin que se pierdan las condiciones de anaerobiosis. Antes de sellarlos se les cambió el aire por una atmósfera de CO_2 y se esterilizaron a 15 $\text{lb}_f/\text{pulg}^2$.

Para cada cinética se prepararon dos frascos serológicos de 500 mL, provistos de tapón de neopreno y tapa roscada, con 360 mL de medio de cultivo, preparado según técnica ya descrita; a uno de ellos se le adicionó probiótico. Se inocularon los frascos con 40 mL de inóculo cada uno. De los frascos se transfirieron 10 mL de medio, ya inoculado, a los tubos estériles y anaerobios, utilizando jeringas estériles desechables. Lo anterior se ilustra en el siguiente esquema:



Los tubos se incubaron horizontalmente a 37°C y agitación de 200 rpm. Se tomaron muestras, a intervalos regulares de tiempo, durante todo el tiempo de incubación. Las muestras se guardaron en refrigeración a 4°C, hasta realizar las determinaciones de concentración de biomasa, concentración de ácido láctico y concentración total de ácidos grasos volátiles.

4.4.2. Cultivo continuo

El sistema para cultivo continuo, es un fermentador marca B-Braun modelo Biostat-B, consiste en un recipiente de vidrio de borosilicato provisto de chaqueta y baffles, con un volumen total de 6.6 litros, 5 litros de volumen útil y relación Altura/Diámetro (L/D) de 2, en el interior tiene un dispersor de gases y un impulsor con triple juego de propelas, conectado a un motor electrónico de 180 W de corriente directa, mismo que se ubica directamente sobre la tapa del recipiente, que es de acero inoxidable. El motor puede operar en un rango de velocidad de 50 a 1200 rpm. La tapa cuenta con cuatro entradas por donde es posible suministrar antiespumante, ácidos o bases para control de pH, entre otros líquidos. Cuenta también con un electrodo para medir pH y potencial de oxido reducción, termopar para medir temperatura y entradas para toma de muestras. Todo ello está conectado a una unidad de soporte con unidad de medición y control digital integrada, que procesa los datos de temperatura, pH, potencial redox, para realizar acciones de corrección, como activar una o más bombas peristálticas, aumentar o disminuir el flujo de agua de enfriamiento hacia la chaqueta, entre otras. El control global y almacenamiento de datos se lleva a cabo por medio de una computadora que gobierna todo el sistema (Biostat B, Operating Manual).

Se prepararon 2250 mL de medio de cultivo en el reactor, según la técnica descrita en la sección 4.3. Una vez que se alcanzaron condiciones de anaerobiosis en el medio estéril, se inoculó el reactor, que operó a 37 °C y 100 rpm de velocidad de agitación. Se tomaron muestras cada 3 horas y cuando se alcanzó la fase exponencial se inició el cultivo continuo a una tasa de dilución de 0.1 h⁻¹. Se continuó el muestreo con la misma frecuencia. Las muestras se guardaron en refrigeración a 4°C hasta realizar las determinaciones de concentración de biomasa, concentración de ácido láctico y concentración total de ácidos grasos volátiles.

4.5. Tratamiento de muestras

Cada una de las muestras (10 mL), se centrifuga a 5000 rpm durante 25 minutos. Se separa el sobrenadante y se resuspende la biomasa, en un volumen equivalente de agua destilada. La biomasa resuspendida en agua, se utiliza para medir concentración de biomasa. El sobrenadante se filtra en membrana de 0.45 μm , del filtrado se toman 50 μL que se utilizan para medir ácido láctico. Del resto del filtrado se toman 0.5 mL y se mezclan con 0.1 mL de solución de HCl 3N, lo que constituye la muestra para medir ácidos grasos volátiles. Lo anterior se esquematiza en el siguiente diagrama.

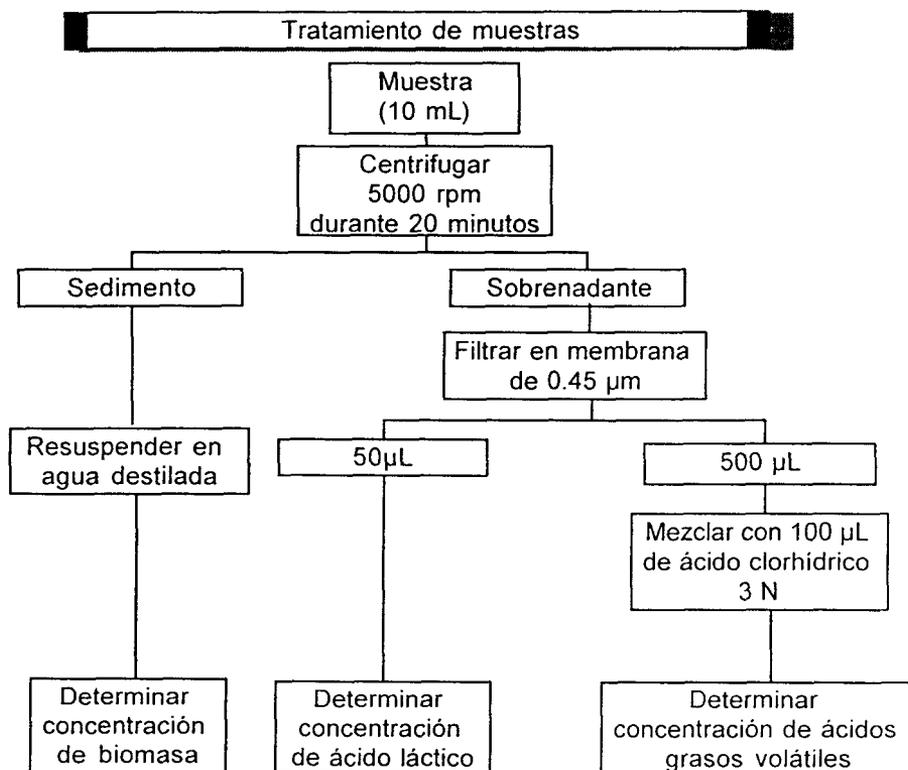


Fig. 4.5.1. Esquema del proceso de tratamiento de muestras.

4.6. Técnicas analíticas

4.6.1. Concentración de biomasa

Se determinó por turbidimetría, leyendo D.O. de la suspensión de células, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, a 660 nm. Si la lectura es mayor a 1 unidad de absorbancia, se hace una dilución adecuada para que la lectura sea menor a 1 unidad de absorbancia. Con la lectura de D.O. se interpola en la curva patrón y se obtiene la concentración de biomasa en g/L (Goodhue *et al.*, 1986).

Para preparar la curva patrón de densidad óptica contra biomasa, se partió de un cultivo de *M. elsdenii* de 20 h de incubación con un volumen aproximado de 500 mL, se tomaron (por cuadruplicado) muestras de 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 y 8 mL; en tubos para centrifuga, que previamente se llevaron a peso constante. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 25 minutos. Se separó el sobrenadante y, en todos los casos, se resuspendieron las células en 5 mL de agua destilada, de manera que, del cultivo original unas muestras se concentraron y otras se diluyeron, excepto las de 5 mL que quedaron con su concentración original. Una vez resuspendidas las muestras, se midió D.O. a 660 nm.

Se centrifugaron las muestras nuevamente, a las mismas condiciones. Se separó el sobrenadante y los tubos con las células se llevaron nuevamente a peso constante. El peso seco de células en cada muestra se determinó por diferencia de peso de los tubos al final del experimento y el peso original. Se construyó una curva patrón de peso seco de biomasa por mililitro contra D.O., que se presenta en la Figura 4.7.1, en la que se puede observar que, en el rango de 0.075 - 0.38 g de biomasa/L y 0.2 - 1 unidades de absorbancia, la relación es lineal entre ambas.

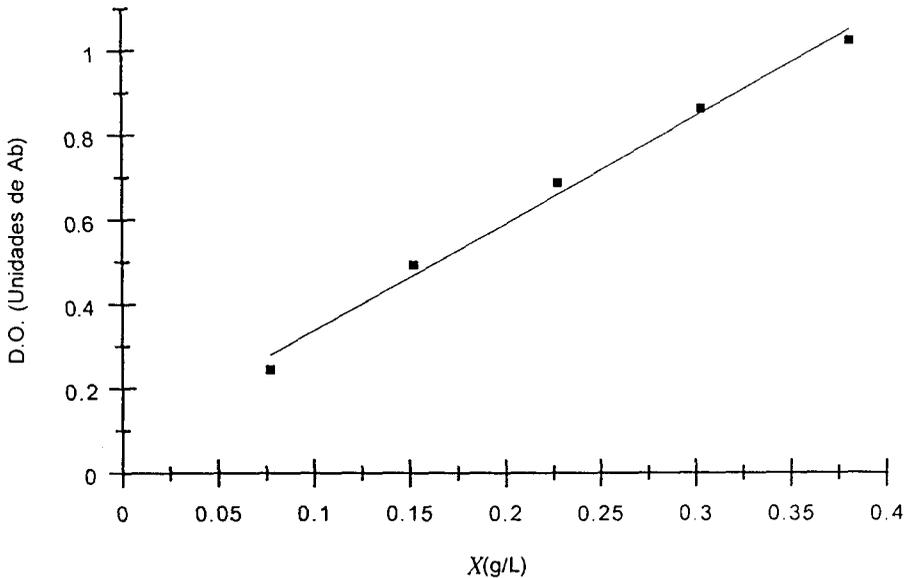


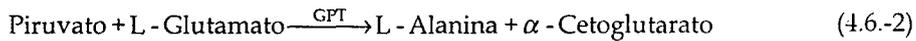
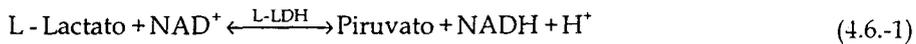
Fig. 4.5.1. Curva patrón de densidad óptica ($D.O.$) contra concentración de biomasa (X). La ecuación de la regresión lineal es $D.O. = 2.52X + 0.09$ con $R^2 = 0.991$.

4.6.2. Concentración de sustrato (ácido láctico)

Se determinó utilizando el método enzimático *D-Lactic acid/L-Lactic acid Enzimatic BioAnalysis* de Boehringer Mannheim, con el cual se determinan, en un mismo análisis, los dos isómeros ópticos del ácido láctico (Boehringer Mannheim, 1997).

El principio de la determinación es el siguiente: el L-lactato es transformado estereoespecíficamente por la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) en presencia de NAD^+ , a piruvato y $NADH+H^+$. Este último es cuantificado por espectrofotometría a 340 nm y presenta una relación equimolar con el L-lactato. Esta reacción presenta desplazamiento del equilibrio hacia el lado del L-lactato; sin embargo, esto es corregido por la presencia en el medio de reacción de L-glutamato, el cual reacciona con el piruvato generado, en presencia del

enzima glutamato piruvato transaminasa (GPT), para dar L-alanina y α -cetoglutarato. El equilibrio de ésta reacción está casi totalmente desplazado hacia el lado de la L-alanina. A continuación se presenta un esquema de las reacciones involucradas.



La determinación del D-lactato es idéntica pero utilizando D-lactato deshidrogenasa, que también es estereoespecífica, en lugar de L-lactato deshidrogenasa (Boehringer Mannheim, 1997).

4.6.3. Concentración de ácidos grasos volátiles

Se determina por cromatografía de gases (Jouany, 1982). Se inyectan 3 μL de la mezcla a un cromatógrafo de gases que utiliza nitrógeno como fase móvil (30mL/min) y *Porapak* (80 - 100 mallas) como fase estacionaria, empacado en una columna de acero inoxidable de 1 mm de diámetro. Las condiciones utilizadas son: 270°C en el inyector, en la columna 180°C inicial, 240°C final con una rampa de 30°C/minuto y 260°C en el detector. El detector utilizado es de ionización de flama. Se inyectaron muestras de concentración conocida (0.5, 1, 3 y 6 g/L) para comparar las áreas de los picos y obtener la concentración de las muestras problema. Los tiempos de retención típicos son:

Compuesto	Tiempo de retención (Minutos)
Acido acético	0.8
Acido propiónico	1.5
Acido butírico	2.2

4.7. Estrategia experimental

Se realizaron tres grupos de experimentos para hacer un total de siete cinéticas, en cultivo por lotes. En el primer experimento se llevaron a cabo tres cinéticas, con una concentración inicial de sustrato de 11.7 ± 0.1 g/L; una sin probiótico,

una con probiótico y en una cinética más, se adicionó extracto de levadura en lugar de probiótico, en la misma concentración (0.675 g/L). El extracto de levadura se preparó e incorporó al medio, siguiendo el mismo procedimiento empleado para el probiótico.

En el segundo experimento, se llevaron a cabo dos cinéticas más, pero con concentraciones iniciales de sustrato de 7.85 ± 0.05 g/L (con probiótico).

En el experimento tres se evaluó el efecto de la edad del inóculo, llevándose a cabo dos cinéticas, a una concentración inicial de sustrato de 9.4 ± 0.05 g/L (con probiótico).

En todos los casos se tomaron muestras, por duplicado, a intervalos regulares de tiempo, realizándose el tratamiento y análisis previamente descritos.

4.8. Expresión de resultados

Los resultados se presentan en forma de gráficas elaboradas en KaleidaGraf 3.0. En primer lugar se presentan comparaciones de cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto. A continuación las mismas cinéticas se comparan nuevamente, pero utilizando tasas específicas en lugar de concentraciones. Para comparar los datos experimentales, con las predicciones del modelo, se utilizan datos normalizados. Los procedimientos, para obtener los datos normalizados y las tasas específicas, se detallan a continuación.

Los resultados se normalizaron, dividiendo cada concentración entre la concentración máxima local observada para cada especie. Por ejemplo, al normalizar los datos de la cinética realizada sin probiótico y con una concentración inicial de sustrato de 11.81 g/L, las concentraciones máximas fueron: para biomasa 0.95 g/L, para sustrato 11.81 g/L y para producto 10.75 g/L; de manera que para normalizar los datos al máximo local, las concentraciones de biomasa se dividieron entre 0.95, las concentraciones de sustrato se dividieron entre 11.81 y las concentraciones de producto se dividieron entre 10.75. De esta manera, se obtienen cinéticas de crecimiento,

consumo de sustrato y formación de producto cuyos valores están en el intervalo de 0 - 1. Nótese que los datos normalizados son adimensionales.

Las tasas específicas de crecimiento (μ), consumo de sustrato (q_s) y formación de producto (q_p), se calcularon, punto a punto, utilizando las siguientes relaciones (Wang *et al.*, 1979):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4.8.-1)$$

$$q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (4.8.-2)$$

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (4.8.-3)$$

Como se puede apreciar en las ecuaciones anteriores, se requieren estimados de las derivadas. Los estimados de las derivadas se obtuvieron utilizando el paquete Microcal Origin 3.5, que lleva a cabo la estimación en cada punto, a través del siguiente procedimiento: calcula la pendiente de la recta que pasa por el punto en que va a estimar la derivada y el punto anterior de la curva, repite el mismo procedimiento pero utilizando el siguiente punto y toma el promedio de las pendientes; el promedio es la estimación de la derivada. Una vez estimado el valor de la derivada, éste se divide entre la concentración de biomasa correspondiente.

4.9. Simulación numérica del modelo y evaluación de parámetros

Las simulaciones numéricas del modelo, se realizaron mediante un programa escrito en lenguaje FORTRAN 77, que utiliza el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden, de paso constante. Para la evaluación de parámetros se procedió de la siguiente manera:

a) *Parámetros determinados directamente de datos experimentales.* Los parámetros que se determinaron directamente de los datos experimentales, fueron el coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato ($Y_{X/S}$), el

coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa ($Y_{P/X}$) y la constante de muerte del modelo celular (K_d). Se determinaron con los puntos correspondientes a la fase de crecimiento, utilizando las siguientes relaciones:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (4.7.-1)$$

donde:

X_i	concentración inicial de biomasa
X_f	concentración final de biomasa
S_i	concentración inicial de sustrato
S_f	concentración final de sustrato

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_i}{X_f - X_i} \quad (4.7.-2)$$

donde:

X_i	concentración inicial de biomasa
X_f	concentración final de biomasa
P_i	concentración inicial de producto
P_f	concentración final de producto

Para el caso de la fase de muerte, se supuso que ésta sigue el modelo que se presenta a continuación:

$$\frac{dX}{dt} = -K_d X \quad (4.7.-3)$$

donde:

X	concentración de biomasa
t	tiempo
K_d	constante de muerte

de manera que tomando el logaritmo natural de la concentración de biomasa contra el tiempo, y ajustando una línea recta, se obtiene el valor de la pendiente, que corresponde al valor de la constante de muerte, en la fase de decaimiento celular.

b) *Parámetros ajustados*. Los parámetros que se ajustaron fueron: la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) y la constante de afinidad (K_S) del modelo de Monod. Para lograr el ajuste, se llevaron a cabo simulaciones numéricas utilizando el modelo matemático que se presenta en la sección 6.3.1. Se llevaron a cabo simulaciones, proporcionando un par de valores de los parámetros cada vez, de acuerdo a un diseño experimental tipo simplex-centroide (Scheffé, 1963), variando μ_{\max} en el rango de 0.1 a 1 h⁻¹ y K_S en el rango de 0.1 a 1.5 g/L. Los datos de concentración de biomasa, sustrato y producto que proporcionó la simulación numérica, se compararon con los datos experimentales, para cada una de las cinéticas realizadas, mediante la función índice de desempeño (J), que en el caso específico del presente trabajo está definida como sigue:

$$J = \sum_{i=1}^N \left[\left(\frac{X_i - X_i^*}{X_{\max}} \right)^2 + \left(\frac{S_i - S_i^*}{S_{\max}} \right)^2 + \left(\frac{P_i - P_i^*}{P_{\max}} \right)^2 \right] \quad (4.7.-4)$$

donde las variables sin asterisco son los datos calculados por simulación, los datos con asterisco son los datos experimentales correspondientes, y las variables con subíndice *max* son los valores máximos experimentales.

Se repitió el mismo procedimiento utilizando, en lugar del índice de desempeño, la función "chi cuadrada" (χ^2), que está definida como sigue:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left[\left(\frac{X_i - X_i^*}{\sigma_i} \right)^2 + \left(\frac{S_i - S_i^*}{\sigma_i} \right)^2 + \left(\frac{P_i - P_i^*}{\sigma_i} \right)^2 \right] \quad (4.7.-5)$$

donde σ_i es la desviación estándar que corresponde a cada par de datos comparados.

El par de valores de μ_{\max} y K_S que corresponden al mejor ajuste, son aquellos para los cuales los valores de J y χ^2 son mínimos. Los mínimos de ambas funciones se determinaron mediante la construcción de superficies de respuesta (Myers *et al.*, 1989), graficando J y χ^2 en función de μ_{\max} y K_S .

DESARROLLO DEL MODELO MATEMATICO

5. Desarrollo del modelo matemático

Como se menciona en el capítulo 1 del presente documento, los procesos de fermentación se caracterizan por la capacidad de una población microbiana, para la formación de más biomasa y algún(os) producto(s), a expensas de la degradación de un sustrato. El modelo físico de los procesos es descrito por un arreglo de ecuaciones, algebraicas y diferenciales, derivadas de balances que involucran el modelado del crecimiento microbiano (Maher *et al.*, 1995).

El desarrollo del modelo en este trabajo se llevará a cabo mediante balances de masa que concluirán con un modelo a nivel celular-medioambiente, es decir, se propone el desarrollo de un modelo no estructurado (ya que no se tomará en cuenta la dinámica interna de la célula), no segregado (pues se considerarán células de un mismo estado fisiológico), en el cual el sistema de fermentación será descrito por un arreglo de ecuaciones diferenciales ordinarias, una para cada variable de estado. Siguiendo las recomendaciones de Luyben (1973), a continuación, se desarrollan las ecuaciones del modelo partiendo de un balance general, primero para cultivo por lotes y después para cultivo continuo.

La propuesta inicial, es un modelo simple que no incorpora la presencia del probiótico. La razón de esto, es que se intentara primero ajustar los parámetros, con la finalidad de detectar cambios en ellos, que pueden ser atribuidos a la presencia del probiótico; lo cual puede marcar directrices para modificar el modelo, e incorporar la presencia del probiótico en los términos en que tenga impacto.

5.1. Descripción de las bases del modelo

El sistema de fermentación se describe en detalle en la sección 4.4. del presente documento. Consiste en recipientes cilíndricos que contienen caldo de cultivo, y poseen temperatura y agitación controladas. Las variables que definen el estado del sistema son:

X	Concentración de biomasa, en g/L
S	Concentración de sustrato, en g/L
P	Concentración de producto, en g/L

En el sistema de fermentación se introduce un inóculo que, una vez homogeneizado, proporcionará una concentración inicial de biomasa (X_0), consumirá el sustrato (ácido láctico), presente en el medio en una concentración inicial (S_0), formando más biomasa y una mezcla de los ácidos grasos volátiles (AGV's) acético, propiónico y butírico, que en su conjunto se denominan producto, el cual al comienzo de la fermentación se encuentra en una concentración inicial (P_0), debido a que el inóculo contiene una pequeña cantidad.

Se parte de una ecuación de balance general de masa (Characklis, 1983):

$$\left[\begin{array}{l} \text{Tasa de variación} \\ \text{del componente } i \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Tasa de adición del} \\ \text{componente } i \text{ al sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Tasa de remoción del} \\ \text{componente } i \text{ del sistema} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Tasa de producción del} \\ \text{componente } i \text{ en el sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Tasa de consumo del} \\ \text{componente } i \text{ en el sistema} \end{array} \right] \quad (5.1.-1)$$

que en forma matemática se escribe:

$$\frac{d}{dt}(VC_i) = QC_{i,a} - QC_i + VR_{p,i} - VR_{c,i} \quad (5.1.-2)$$

donde:

V	volumen de reacción
C_i	concentración del componente i en el sistema
$C_{i,a}$	concentración del componente i en la alimentación
Q	flujo volumétrico
$R_{p,i}$	tasa de producción del componente i en el sistema
$R_{c,i}$	tasa de consumo del componente i en el sistema

A continuación se deberán incorporar las hipótesis de trabajo de la siguiente sección.

5.2. Proposición de hipótesis de trabajo

Para el desarrollo de las ecuaciones del modelo, se propusieron las siguientes hipótesis:

- 1) El volumen de reacción y la densidad son constantes.
- 2) El mezclado es ideal, no existen gradientes de temperatura ni de concentración.
- 3) No hay consumo de biomasa, ni producto, en el sistema.
- 4) No hay producción de sustrato en el sistema.
- 5) El consumo de sustrato es debido a la formación de biomasa y a mantenimiento celular.
- 6) La formación de biomasa es proporcional a la concentración de biomasa presente, es decir, se asume cinética de primer orden con respecto a la concentración de biomasa (Blanch, 1981).
- 7) La formación de producto es parcialmente ligada a crecimiento.
- 8) La biomasa está formada por células en el mismo estado fisiológico y sin dinámica interna, en todo momento de la fermentación. Por lo tanto se considerará un sólo modelo celular no estructurado, que se aplicará a lo largo de la fermentación.
- 9) Se considera que la alimentación, cuando la hay, es estéril y está libre de producto.

Se considerarán ahora las hipótesis planteadas para el desarrollo de un modelo para cultivo por lotes y posteriormente para cultivo continuo.

5.3. Modelo para cultivo por lotes.

a) Para la biomasa:

Como se trata de cultivo en lotes, no existen entradas ni salidas al sistema, por lo tanto, la ecuación (5.1.-2), utilizando la hipótesis 3, se reduce a:

$$\frac{d(VX)}{dt} = VR_X \quad (5.3.-1)$$

Utilizando la hipótesis 1, según la cual el volumen de reacción es constante:

$$\frac{dX}{dt} = R_X \quad (5.3.-2)$$

Por la hipótesis 6, la tasa de formación de biomasa se puede expresar como $R_X = \mu X$ por lo tanto, la ecuación (5.3.-1) queda:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (5.3.-3)$$

Tomando en cuenta la hipótesis 8 y considerando el modelo de Monod (Monod, 1942), para la tasa específica de crecimiento, μ :

$$\frac{dX}{dt} = \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) X \quad (5.3.-4)$$

La condición inicial para esta ecuación es: a $t = 0$ $X = X_0$ o bien $X(0) = X_0$.

b) Para el sustrato:

Como se trata de cultivo en lotes, no existen entradas ni salidas al sistema, por lo tanto, la ecuación (5.1.-2), utilizando la hipótesis 4, se reduce a:

$$\frac{d(VS)}{dt} = -VR_S \quad (5.3.-5)$$

Utilizando la hipótesis 1, según la cual el volumen de reacción es constante:

$$\frac{dS}{dt} = -R_S \quad (5.3.-6)$$

Por la hipótesis 5, la tasa de consumo de sustrato se puede expresar como (Pirt, 1975):

$$R_S = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} + mX$$

por lo tanto, la ecuación (5.3.-6) queda:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} - mX \quad (5.3.-7)$$

Tomando en cuenta la hipótesis 8 y considerando el modelo de Monod (Monod, 1942), para la tasa específica de crecimiento, μ :

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}\right) \frac{X}{Y_{X/S}} - mX \quad (5.3.-8)$$

La condición inicial para esta ecuación es: a $t = 0$ $S = S_0$ o bien $S(0) = S_0$.

d) Para el producto:

Como se trata de cultivo en lotes, no existen entradas ni salidas al sistema, por lo tanto, la ecuación (5.1.-2), utilizando la hipótesis 3, se reduce a:

$$\frac{d(VP)}{dt} = VR_p \quad (5.3.-9)$$

Utilizando la hipótesis 1, según la cual el volumen de reacción es constante:

$$\frac{dP}{dt} = R_p \quad (5.3.-10)$$

Por la hipótesis 7, la tasa de formación de producto se puede expresar como (Luedeking y Piret, 1959):

$$R_p = \alpha\mu X + \beta X$$

por lo tanto, la ecuación (5.3.-10) queda:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\mu X + \beta X \quad (5.3.-11)$$

Tomando en cuenta la hipótesis 8 y considerando el modelo de Monod (Monod, 1942), para la tasa específica de crecimiento, μ :

$$\frac{dP}{dt} = \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) \alpha X + \beta X \quad (5.3.-12)$$

La condición inicial para está ecuación es: a $t = 0$ $P = P_0$ o bien $P(0) = P_0$.

El modelo matemático inicial para cultivo por lotes, constituido por las ecuaciones (5.3.-4), (5.3.-8) y (5.3.-12), de las cuales forman parte sus correspondientes condiciones iniciales, fue derivado para cultivo por lotes, utilizando las hipótesis de la sección 5.2. y debe ser ahora modificado y/o soportado por las observaciones experimentales; de manera que se retomará en la sección 7.1., del presente documento.

5.4. Modelo para cultivo continuo

a) Para la biomasa:

La ecuación (5.1.-2) para biomasa, utilizando la hipótesis 3, se escribe:

$$\frac{d(VX)}{dt} = QX_a - QX + VR_X \quad (5.4.-1)$$

Por la hipótesis 9, no hay biomasa en la corriente de entrada y:

$$\frac{d(VX)}{dt} = -QX + VR_X \quad (5.4.-2)$$

Utilizando la hipótesis 1, según la cual el volumen de reacción es constante y definiendo la tasa de dilución como $D = Q/V$:

$$\frac{dX}{dt} = -DX + R_X \quad (5.4.-3)$$

Por la hipótesis 6, la tasa de formación de biomasa se puede expresar como $R_X = \mu X$ por lo tanto, la ecuación (5.4.-3) queda:

$$\frac{dX}{dt} = -DX + \mu X \quad (5.4.-4)$$

Tomando en cuenta la hipótesis 8 y considerando el modelo de Monod (Monod, 1942), para la tasa específica de crecimiento, μ :

$$\frac{dX}{dt} = -DX + \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) X \quad (5.4.-5)$$

La condición inicial para esta ecuación es: a $t = 0$ $X = X_0$ o bien $X(0) = X_0$.

b) Para el sustrato:

La ecuación (5.1.-2) para el sustrato, utilizando la hipótesis 4, se escribe:

$$\frac{d(VS)}{dt} = QS_a - QS - VR_S \quad (5.4.-6)$$

Utilizando la hipótesis 1, según la cual el volumen de reacción es constante y definiendo la tasa de dilución como $D = Q/V$:

$$\frac{dS}{dt} = DS_a - DS - R_S \quad (5.4-8)$$

Por la hipótesis 5, la tasa de consumo de sustrato se expresar como (Pirt, 1975):

$$R_S = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} + mX$$

por lo tanto, la ecuación (5.4-8) queda:

$$\frac{dX}{dt} = D(S_a - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} - mX \quad (5.4-9)$$

Tomando en cuenta la hipótesis 8 y considerando el modelo de Monod (Monod, 1942), para la tasa específica de crecimiento, μ :

$$\frac{dX}{dt} = D(S_a - S) - \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) \frac{X}{Y_{X/S}} - mX \quad (5.4-10)$$

La condición inicial para está ecuación es: a $t = 0$ $S = S_0$ o bien $S(0) = S_0$.

d) Para el producto:

La ecuación (5.1.-2) para producto, utilizando la hipótesis 3, se escribe:

$$\frac{d(VP)}{dt} = QP_a - QP + VR_p \quad (5.4-11)$$

Por la hipótesis 9, no hay producto en la corriente de entrada y:

$$\frac{d(VP)}{dt} = -QP + VR_p \quad (5.4-12)$$

Utilizando la hipótesis 1, según la cual el volumen de reacción es constante y definiendo la tasa de dilución como $D = Q/V$:

$$\frac{dP}{dt} = -DP + R_p \quad (5.4.-13)$$

Por la hipótesis 7, la tasa de formación de producto se puede expresar como (Luedeking y Piret, 1959):

$$R_p = \alpha\mu X + \beta X$$

por lo tanto, la ecuación (5.4.-13) queda:

$$\frac{dP}{dt} = -DP + \alpha\mu X + \beta X \quad (5.4.-14)$$

Tomando en cuenta la hipótesis 8 y considerando el modelo de Monod (Monod, 1942), para la tasa específica de crecimiento, μ :

$$\frac{dP}{dt} = -DP + \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \right) \alpha X + \beta X \quad (5.4.-15)$$

La condición inicial para esta ecuación es: a $t = 0$ $P = P_0$ o bien $P(0) = P_0$.

El modelo matemático inicial para cultivo continuo, constituido por las ecuaciones (5.4.-5), (5.4.-10) y (5.4.-15), de las cuales forman parte sus correspondientes condiciones iniciales, se retomará en la sección 7.4.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan los resultados experimentales de modificación del medio de cultivo, en cuanto a concentración de fuentes de carbono y nitrógeno. En seguida, los resultados de las cinéticas para determinación del efecto del probiótico comercial *Yea Sacc 1026*, sobre el cultivo por lotes de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*. A continuación se presentan y discuten los resultados sobre el efecto de la edad del inóculo. En todos los casos se presentan los resultados de estimación de parámetros, que puede ser determinados directamente de los datos experimentales.

6.1. Modificación del medio de cultivo

Se partió del medio de cultivo que recomienda la Colección Española de Cultivos Tipo (ver sección 4.3.), del cual se modificaron la concentración de la fuente de carbono (ácido láctico), que es el sustrato limitante y la concentración de la fuente de nitrógeno. La finalidad de modificar el medio de cultivo obedece a dos razones. En primer lugar, el medio de cultivo recomendado presenta una concentración de ácido láctico de 1.6 g/L, siendo que la acidosis láctica, se define como pH ruminal menor a 5.2 y concentración de ácido láctico de 1.8 g/L, llegándose a encontrar concentraciones hasta de 3.8 g/L *in vivo* (Kung y Hession, 1995); se desea evaluar el modelo experimental en términos de la concentración de ácido láctico.

Una vez fijada la concentración inicial de ácido láctico en el medio de cultivo, el siguiente paso fue modificar la concentración de la fuente de nitrógeno, constituida por peptona de caseína, extracto de carne y extracto de levadura. Las fuentes antes mencionadas, son de naturaleza compleja, por lo cual hacen que el medio de cultivo sea indeterminado y muy rico, lo que podría enmascarar o hacer muy difícil de observar el efecto del probiótico.

6.1.1. Concentración de la fuente de carbono y energía

Se realizaron fermentaciones de 36 h de duración, utilizando concentraciones crecientes de ácido láctico (0, 5, 10, 15 y 20 g/L). Los resultados se muestran en la Figura 6.1.1., donde se grafica la concentración inicial de ácido láctico, contra la concentración de biomasa al final del tiempo de incubación.

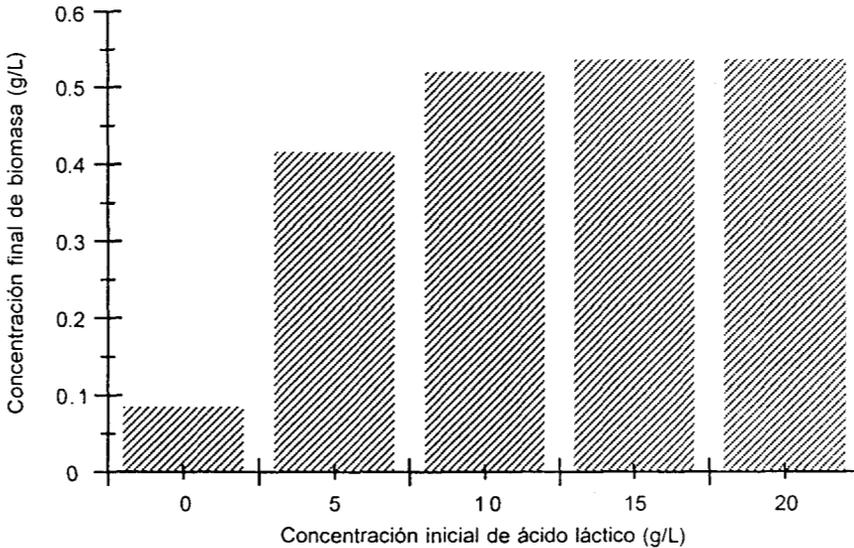


Fig. 6.1.1. Efecto de diferentes concentraciones iniciales de ácido láctico, sobre el crecimiento de *M. elsdenii*, después de 36 h de incubación.

Se encontró que, hasta 20 g/L, es posible que no se presentan efectos de inhibición por sustrato. No existe diferencia apreciable con las concentraciones de 10 y 15 g/L. Por otra parte, se aprecia que existe un crecimiento considerable a la concentración de sustrato de 0 g/L, donde no debía presentarse; esto se explica por la presencia de las fuentes de nitrógeno, que son de naturaleza compleja, y proporcionan alguna cantidad de carbono y energía, que permiten el crecimiento. A partir de la concentración de 10 g/L, no se observa que los aumentos sucesivos en la concentración inicial de ácido láctico, produzcan aumento en la concentración final de la biomasa. Con los resultados anteriores,

se decidió fijar la concentración de ácido láctico en 10 g/L, para los experimentos posteriores, debido a que es superior a la concentración que define el estado de acidosis láctica y produce concentraciones de biomasa que no presentarán problemas para medirse. En adelante se utilizará la palabra sustrato, para referirse a la fuente de carbono, que es el ácido láctico.

6.1.2. Concentración de la fuente de nitrógeno

Se modificó la concentración de la fuente de nitrógeno, manteniendo siempre la proporción original entre los componentes de la misma (peptona de caseína, extracto de carne y extracto de levadura, para concentración final ver sección 4.3.). Para ello se realizaron fermentaciones de 36 h, con diferentes fracciones de la concentración original de la fuente de nitrógeno; se utilizó 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, y 1, siendo 1 la concentración original recomendada. Los resultados se presentan a continuación en la Figura 6.1.2., donde se grafica la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, como fracción de la concentración en el medio original, contra la concentración final de biomasa.

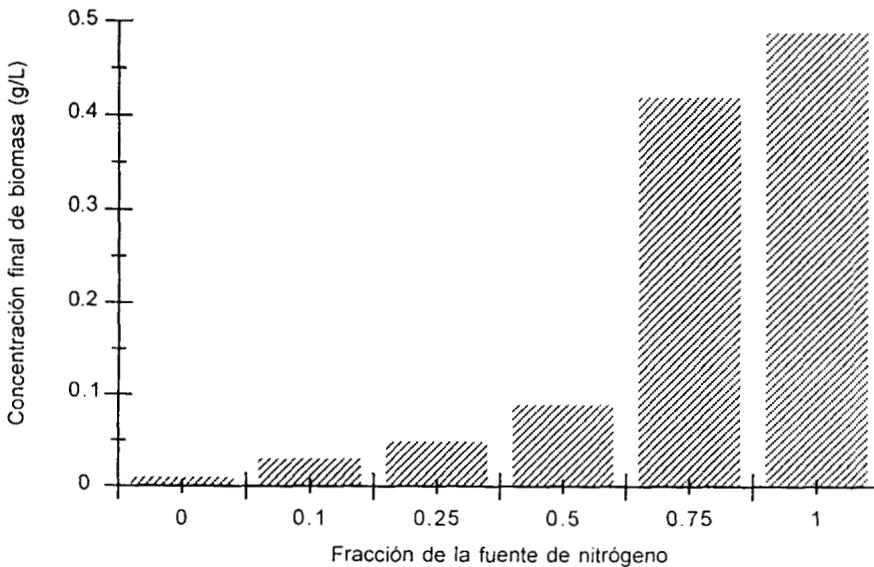


Fig. 6.1.2. Efecto de diferentes fracciones de la concentración inicial de fuente de nitrógeno, sobre el crecimiento de *M. elsdenii*, después de 36 h de incubación.

Es evidente que la concentración de la fuente de nitrógeno no se puede disminuir a menos de 0.75 de la concentración original sin que se obtenga una caída muy brusca en el crecimiento de *Megasphaera elsdenii*, a pesar de que la concentración inicial de sustrato es de 10 g/L. Por lo tanto, se decidió fijar la concentración de la fuente de nitrógeno en 0.8 veces la concentración en el medio recomendado, con lo cual se logra una reducción de 20% de la concentración original de la fuente de nitrógeno. En lo subsecuente, la composición del medio de cultivo es la indicada en la sección 4.3.

6.2. Efecto del probiótico *Yea Sacc 1026* sobre el cultivo sumergido por lotes de *Megasphaera elsdenii*

Los resultados presentados a continuación, tiene por objeto observar el efecto del probiótico comercial *Yea Sacc 1026*, sobre el cultivo por lotes de *M. elsdenii*, bajo diferentes condiciones. En todos los casos, se trabajó con muestras por duplicado.

En esta sección (6.2.) se presentan los resultados del cultivo por lote, con inóculo fresco, con una concentración inicial de sustrato de aproximadamente 12 g/L, mientras que en la sección 6.3. los resultados presentados se obtuvieron con una concentración inicial de sustrato de aproximadamente 8 g/L; es decir, 2 g/L por arriba y por debajo de la concentración fijada en los experimentos anteriores, con la finalidad de establecer si el efecto del probiótico, se ve modificado por la concentración de sustrato.

Para los resultados presentados en la sección 6.4., se utilizó inóculo viejo y una concentración inicial de sustrato de aproximadamente 10 g/L, para evaluar el efecto de la edad del inóculo.

En el caso de los resultados de la presente sección, se llevaron a cabo tres cinéticas, una con probiótico, una sin probiótico y una tercera cinética, en la que se adicionó extracto de levadura en una concentración igual al probiótico (0.675 g/L, en el medio de fermentación), para descartar la posibilidad de que el efecto del probiótico, sea resultado de la adición de más sustrato al medio. El

probiótico comercial utilizado (*Yea Sacc 1026*), es el producto seco de una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, de manera que el extracto de levadura puede considerarse un aditivo similar. El extracto de levadura adicionado se preparó e incorporó al medio, siguiendo un procedimiento idéntico al que se sigue para el probiótico.

6.2.1. Cinética de crecimiento

A continuación, en la gráfica de la Figura 6.2.1., se presentan las concentraciones de biomasa contra el tiempo.

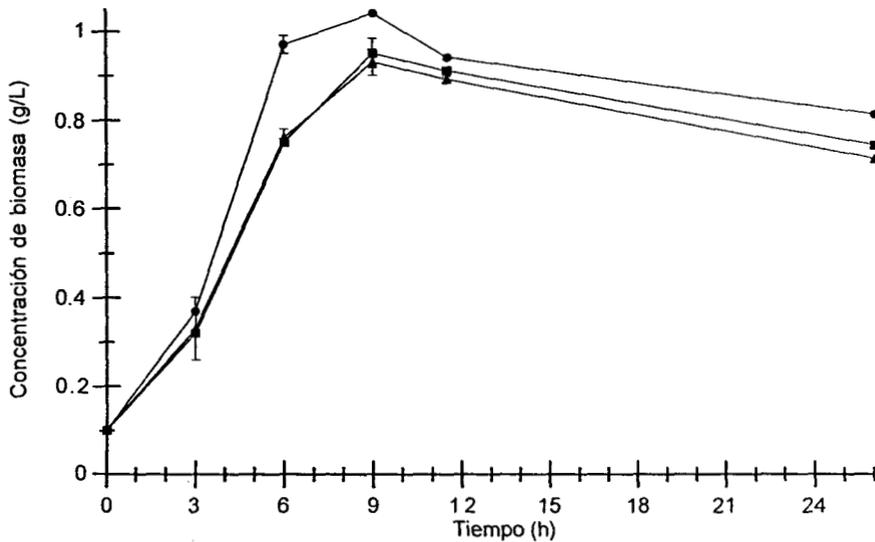


Fig. 6.2.1. Comparación de las cinéticas de crecimiento de *M. elsdenii*, sin probiótico (■), con probiótico (●) y con extracto de levadura (▲), en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

En la figura anterior se aprecia que *M. elsdenii*, en presencia del probiótico *Yea Sacc 1026*, presenta un crecimiento más rápido, además de que la concentración máxima de biomasa, es mayor que cuando no se tiene probiótico en el medio. Es evidente, que el probiótico produce un efecto potenciador del crecimiento, que no es producto de una relación estequiométrica debida a la adición de más sustrato, ya que en el caso de la cinética con extracto de

levadura, se presentaron resultados iguales a la cinética sin probiótico. Es probable que las diferencias, entre la cinética con probiótico y las dos que no lo tienen, sean significativas, pues las barras de error (obtenidas de las desviaciones estándar) no se traslapan; mientras que, entre la cinética sin probiótico y aquella en que se adicionó extracto de levadura, no existe diferencia significativa.

Es importante notar que se observan dos fases en las curvas de cada cinética; una fase de crecimiento, la cual culmina, como se verá mas adelante, al agotarse el sustrato y una vez alcanzada la concentración máxima de biomasa, se inicia una fase de muerte, que en todos los casos presenta una tendencia muy similar, por lo cual es probable que se deba contemplar un término de muerte celular, en las ecuaciones del modelo.

Una forma adicional de comparar las cinéticas, y observar el efecto del probiótico, es comparando la tasa específica de crecimiento (μ) durante la fase exponencial. Si se integra la ecuación (5.3.-3), se obtiene:

$$\text{Ln}X = \mu X + C \quad (6.2.-1)$$

La tasa específica de crecimiento en la fase exponencial, se corresponde a la pendiente de la regresión lineal de los datos correspondientes.

En seguida se presenta, en la Figura 6.2.2., la determinación de la tasa específica de crecimiento, durante la fase de exponencial, para las tres cinéticas anteriores.

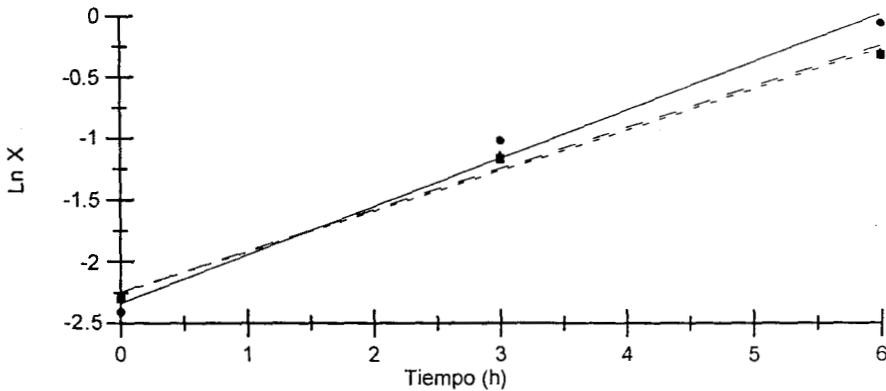


Fig. 6.2.2. Determinación de la tasa específica de crecimiento en la fase exponencial, para las cinéticas sin probiótico (■), con probiótico (●) y con extracto de levadura (▲), en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

Las ecuaciones de las rectas de ajuste son:

Cinética	Ecuación	R^2
Sin probiótico	$\text{Ln}X = 0.33X - 2.25$	0.993
Con extracto de levadura	$\text{Ln}X = 0.33X - 2.25$	0.991
Con probiótico	$\text{Ln}X = 0.39X - 2.34$	0.988

La Figura 6.2.2. y las pendientes de las rectas de regresión anteriores, muestran que el probiótico, efectivamente está potenciando el crecimiento ya que μ , durante la fase exponencial, es aproximadamente un 18% más alta con probiótico que en los casos en que no está presente. Nuevamente se aprecia que la adición de extracto de levadura, en concentración y condiciones iguales al probiótico, no tiene un efecto similar al de éste.

6.2.2. Cinética de consumo de sustrato

En cuanto a las cinéticas de consumo de sustrato en el experimento uno, la Figura 6.2.3., que aparece a continuación, presenta los resultados correspondientes.

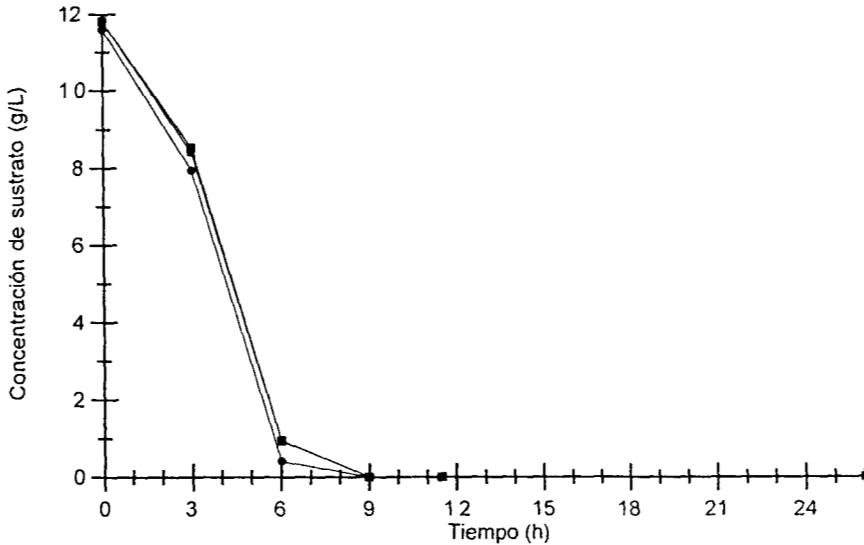


Fig. 6.2.3. Comparación de las cinéticas de consumo de sustrato sin probiótico (■), con probiótico (●) y con extracto de levadura (▲), en cultivo por lote con concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

La gráfica de la Figura 6.2.3., muestra que el sustrato se consume ligeramente más rápido, en presencia de probiótico y que las diferencias probablemente son significativas, ya que las barras de error no se traslapan. Cabe destacar que el agotamiento total del sustrato, coincide con el tiempo (9 Horas), al que se alcanza la máxima concentración de biomasa. Es posible que la fase de muerte, se presente por la total carencia de sustrato en el medio.

En términos cualitativos, podría decirse que no existe diferencia y que la presencia del probiótico, no mejora apreciablemente la capacidad de *M. elsdenii* para consumir el sustrato, ya que los perfiles de las curvas son muy similares, aunque también es notorio que las curvas correspondientes a las cinéticas sin probiótico y con extracto de levadura están prácticamente sobrepuestas.

De manera similar que en el caso del crecimiento, es posible comparar la tasa específica de consumo de sustrato (q_s), la cual se obtiene utilizando la siguiente ecuación:

$$q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (6.2.-2)$$

como se detalla en la sección 4.8. del presente documento. q_s es una medida de la eficiencia de las células para utilizar el sustrato (Wang *et al.*, 1979); se presenta a continuación, en la Figura 6.2.4., una comparación de la respectiva tasa específica de consumo de sustrato.

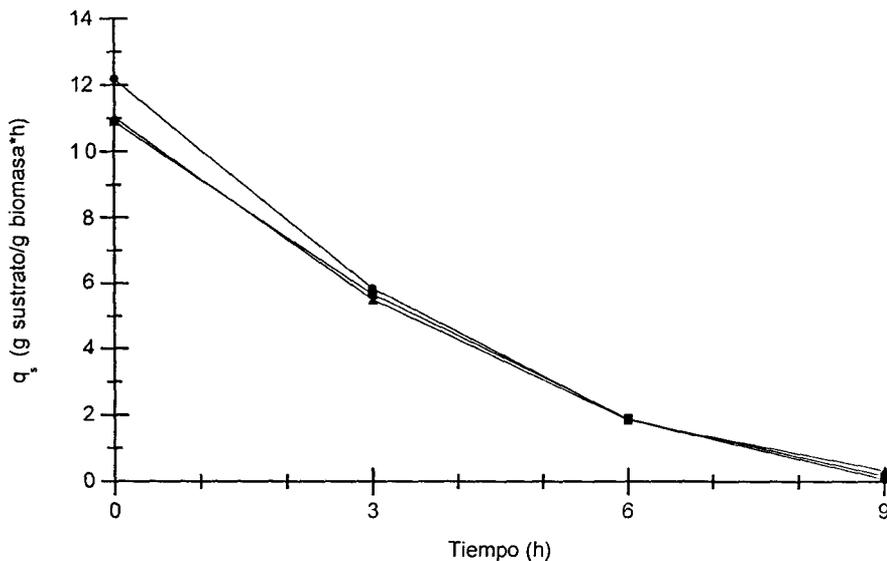


Fig. 6.2.4. Comparación de las tasas específicas de consumo de sustrato sin probiótico (■), con probiótico (●) y con extracto de levadura (▲), en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

En la figura 6.2.4. se aprecia de manera más clara que la adición de probiótico promueve un consumo de sustrato más eficiente por parte de *M. elsdenii*, lo cual es más notorio al inicio de la fermentación, cuando la concentración de sustrato es más alta. Nuevamente se demuestra que la cinética con extracto de levadura no presenta diferencia con respecto al cultivo sin probiótico.

6.2.3. Cinética de formación de producto

Por otra parte, en lo que concierne a la formación producto, cabe aclarar lo siguiente: se denomina producto a la mezcla de los ácidos grasos volátiles (AGV's) acético, propiónico y butírico y por lo tanto, la concentración de producto es la suma de las concentraciones de estos tres ácidos; la razón de no tratarlos de manera individual, es que experimentalmente se determinó que siempre conservan una misma proporción (por cada mol de acético hay un mol de propiónico y 0.25 mol de butírico), sin importar la presencia o no de probiótico, por lo que para los fines de éste trabajo sólo es relevante la concentración total de AGV's. A continuación, en la Figura 6.2.5. se grafican las cinéticas de formación de producto a lo largo de la fermentación.

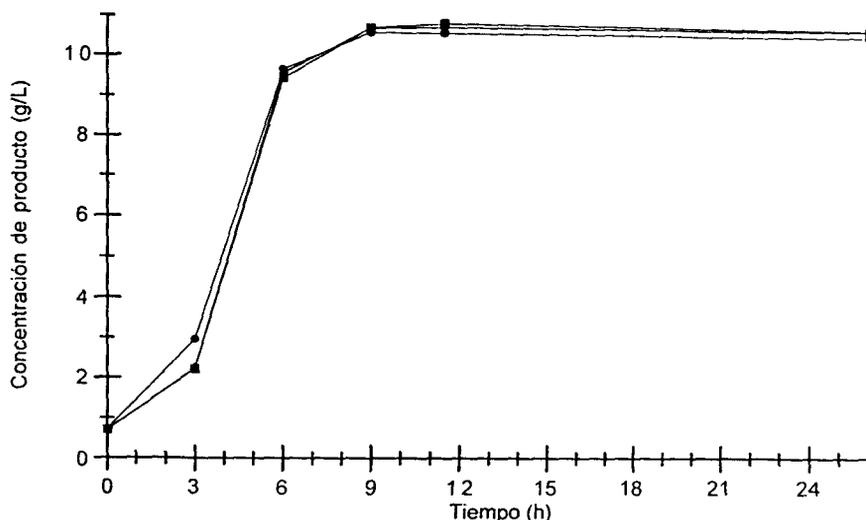


Fig. 6.2.5. Comparación de las cinéticas de formación de producto sin probiótico (■), con probiótico (●) y con extracto de levadura (▲), en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

Puede notarse que en presencia de probiótico, se inicia más rápidamente la formación de producto, lo cual indica que el probiótico también estimula la capacidad de *M. elsdenii* para formar producto, aunque al final se obtiene una menor concentración, lo que concuerda con el hecho de que se observe una mayor concentración de biomasa al final de la fase de crecimiento. Otra observación importante, es que el incremento en la concentración de producto

inicia y concluye al mismo tiempo que la fase de crecimiento, lo cual sugiere que la formación de producto está ligada al crecimiento. Una vez más, es evidente que la adición de extracto de levadura, no produce un efecto comparable al del probiótico.

De manera similar a los dos casos anteriores, crecimiento y consumo de sustrato, las cinéticas de formación de producto pueden compararse utilizando la tasa específica de formación de producto (q_p), calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (6.2-3)$$

como se detalla en la sección 4.9 del presente documento. q_p es una medida de la eficiencia de las células para formar producto (Wang *et al.*, 1979). A continuación se presenta la Figura 6.2.6., en la cual se comparan las tasas específicas de formación de producto.

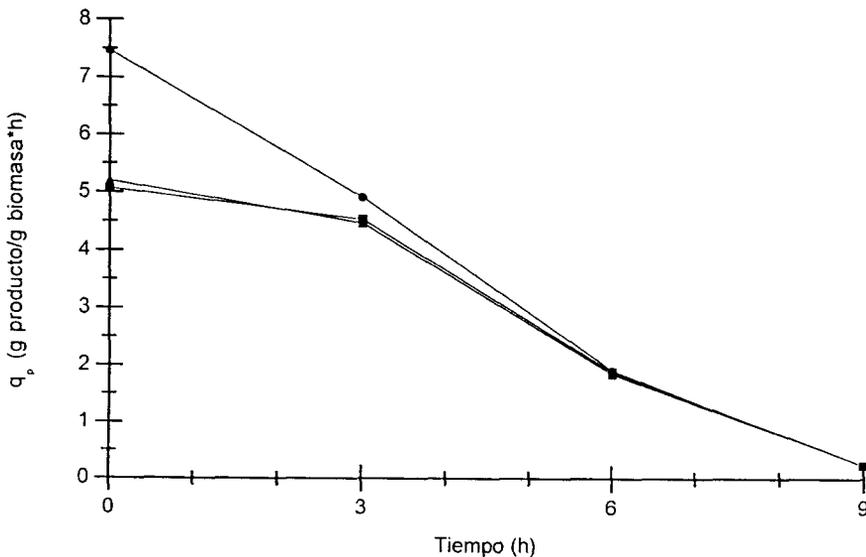


Fig. 6.2.6. Comparación de las tasas específicas de formación de producto sin probiótico (■), con probiótico (●) y con extracto de levadura (▲), en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

La figura anterior muestra que efectivamente el probiótico estimula la capacidad de *M. elsdenii* para formar producto, ya que al inicio de la fermentación existe un incremento en q_p , de aproximadamente 45%, con respecto a las cinéticas donde no hay probiótico. La diferencia se reduce rápidamente, conforme avanza la fermentación. Lo anterior no debe causar confusión por el hecho de que la concentración final de producto sea menor en el caso con probiótico, ya que apesar de que se tiene mayor capacidad de formarlo, la diferencia sólo es muy importante al inicio de la fermentación y disminuye rápidamente.

Para finalizar con los resultados del experimento uno, se presentan a continuación los resultados de la estimación de parámetros del modelo, que puede hacerse directamente de los resultados experimentales.

De acuerdo al inciso *a* de la sección 4.9, del presente documento, se obtuvieron los valores para el coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato ($Y_{X/S}$) y para el coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa ($Y_{P/X}$), aclarando que éste último se es α que aparece en las ecuaciones (5.3.-12) y (5.4.-15), obteniéndose los resultados siguientes:

$Y_{X/S}$ sin probiótico	0.072 g biomasa/g sustrato
$Y_{X/S}$ con probiótico	0.081 g biomasa/g sustrato
$Y_{X/S}$ con extracto de levadura	0.071 g biomasa/g sustrato
$Y_{P/X}$ sin probiótico	11.96 g producto/g biomasa
$Y_{P/X}$ con probiótico	10.37 g producto/g biomasa
$Y_{P/X}$ con extracto de levadura	11.87 g producto/g biomasa

Los resultados anteriores, muestran que la adición de extracto de levadura no afecta los coeficientes de rendimiento del cultivo. La adición de probiótico en cambio, incrementa la formación de biomasa, ya que el coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato, se incrementa en un 12.5%; lo cual es un reflejo de la mayor capacidad de crecimiento, provocada por el probiótico. El coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa,

diminuye un 13.3%, es decir una cantidad equivalente, lo cual concuerda con el hecho de que una mayor cantidad de sustrato, se incorpore a la formación de biomasa, en el caso de adición de probiótico.

Para la fase de decaimiento celular, se supone que la tasa de muerte es proporcional a la concentración de biomasa, por lo tanto:

$$\frac{dX}{dt} = -K_d X \quad (6.2-3)$$

donde (K_d) es la constante de muerte. Dado que K_d es una constante durante toda la fase de muerte, se calcula para el conjunto de puntos de la fase de muerte, graficando la regresión lineal de tiempo contra logaritmo natural de la concentración de biomasa.

Se presenta, como muestra, la Figura 6.2.7., donde se obtiene la constante de muerte de la cinética sin probiótico. En lo subsecuente, se proporcionarán directamente los valores de las constantes de muerte y las figuras correspondientes se pueden consultar en el apéndice dos, al final del presente documento.

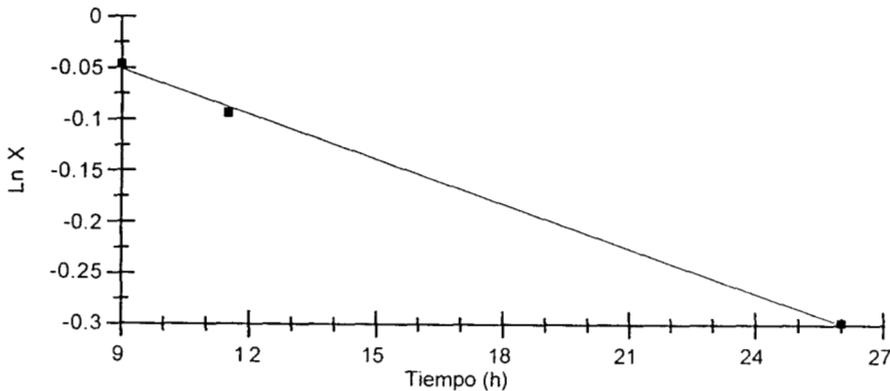


Fig. 6.2.7. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética sin probiótico en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L. La recta de regresión es $\text{Ln}X = -0.0146t$ con coeficiente de correlación $R^2 = 0.998$.

K_d sin probiótico	0.0146 h ⁻¹
K_d con extracto de levadura	0.0159 h ⁻¹
K_d con probiótico	0.0134 h ⁻¹

Los resultados anteriores no muestran gran diferencia en las tasas de muerte, es decir, que la fase de muerte no se ve afectada por el probiótico.

6.3. Influencia de la concentración inicial de sustrato en el efecto del probiótico *Yea Sacc 1026* sobre el cultivo sumergido por lotes de *Megasphaera elsdenii*

En este experimento se llevaron a cabo dos cinéticas, una sin probiótico y una con probiótico a una concentración inicial de sustrato en este experimento de aproximadamente 8 g/L, con lo cual se pretende conocer si el efecto del probiótico, depende de la concentración inicial de sustrato, al comparar los resultados con los del experimento presentado anteriormente.

6.3.1. Cinética de crecimiento

A continuación la Figura 6.3.1., presenta los resultados de las cinéticas de crecimiento, sin y con probiótico.

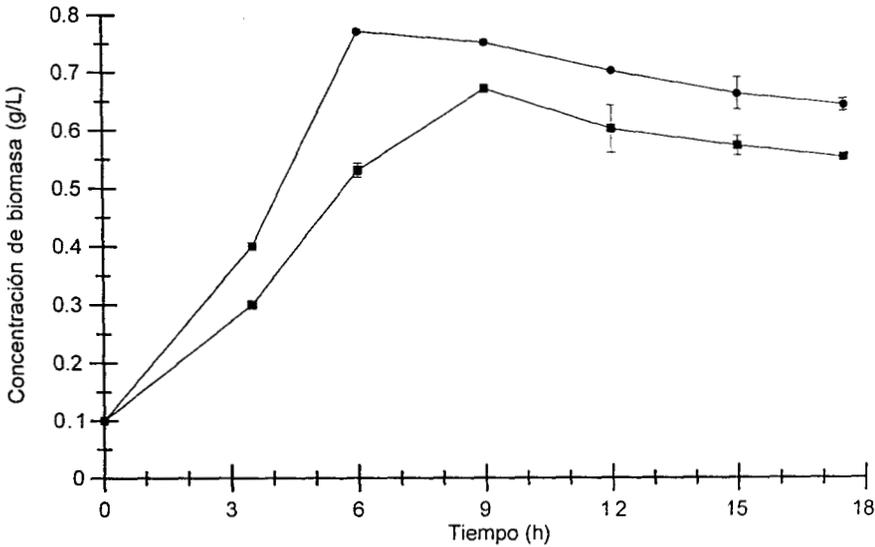


Fig. 6.3.1. Comparación de las cinéticas de crecimiento de *M. eldenii*, sin probiótico (■) y con probiótico (●) en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 8 g/L.

La concentración de biomasa en la figura anterior, muestra un comportamiento similar al que se presenta en el experimento uno, ya que en la cinética con probiótico se obtiene un crecimiento más rápido, pues la pendiente en la fase exponencial es claramente mayor, además de que la concentración al final del crecimiento es mayor. Es importante notar que las barras de error no se traslapan. Un detalle aparentemente diferente es que en la Figura 6.2.1., el crecimiento termina al mismo tiempo en todas las cinéticas, mientras que en la Figura 6.3.1., el crecimiento termina antes en el caso con probiótico; esto es debido posiblemente a que no se tomaron muestras con la frecuencia necesaria, pero es evidente, por las características de las dos figuras, que en ambos casos el crecimiento termina en menor tiempo, cuando existe probiótico en el medio. Lo mismo sucede con las cinéticas de consumo de sustrato y formación de producto.

En seguida se presenta la Figura 6.3.2., donde se determinan las tasas específicas de crecimiento, para las cinéticas sin y con probiótico.

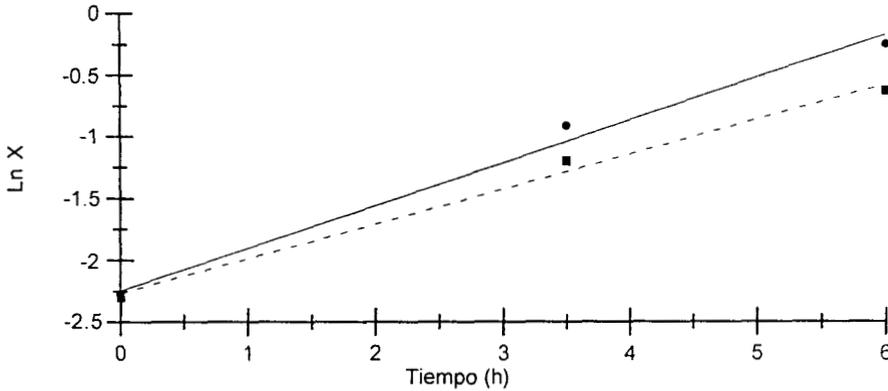


Fig. 6.3.2. Determinación de las tasas específicas de crecimiento de *M. eldenii*, sin probiótico (■) y con probiótico (●) en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 8 g/L.

Las ecuaciones de las rectas de ajuste son:

Cinética	Ecuación	R^2
Sin probiótico	$LnX = 0.28X - 2.27$	0.993
Con probiótico	$LnX = 0.34X - 2.25$	0.988

Al igual que en la Figura 6.2.2., en este caso se observa que la tasa específica de crecimiento con probiótico, es aproximadamente un 21.4% más alta que sin probiótico.

6.3.2. Cinética de consumo de sustrato

A continuación se presenta la Figura 6.3.3., que proporciona los resultados correspondientes a las cinéticas de consumo de sustrato.

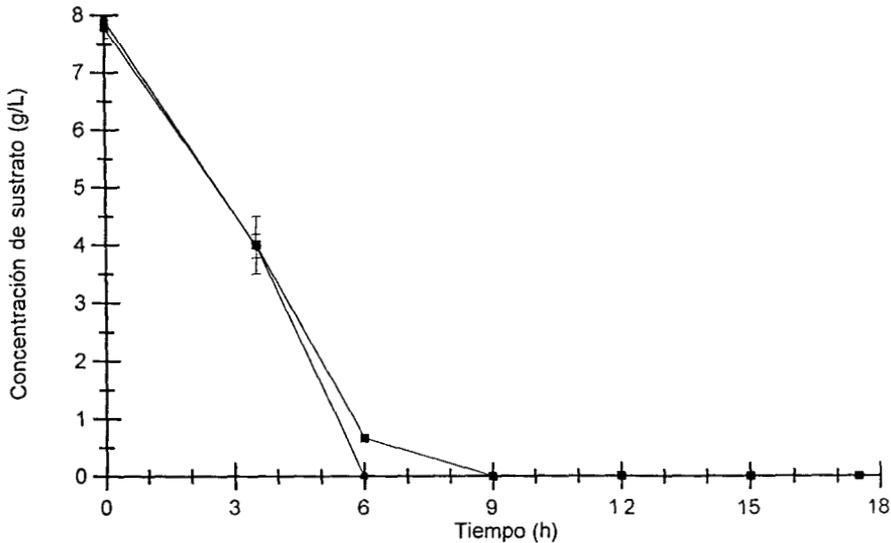


Fig. 6.3.3. Comparación de las cinéticas de consumo de sustrato sin probiótico (■) y con probiótico (●) en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 8 g/L.

En las cinéticas de consumo de sustrato, al igual que en la Figura 6.2.3., correspondiente al experimento anterior, se aprecia un consumo ligeramente más rápido en presencia de probiótico, en cuanto al perfil de las curvas, argumentando además que las barras de error no se traslapan y que, al igual que en el caso del crecimiento, si en Figura 6.2.3. no se observa, como en la Figura 6.3.3, que el consumo concluye en un tiempo menor es por falta de un muestreo más frecuente.

A continuación se presenta, en la Figura 6.3.4., la comparación de las tasas específicas de consumo de sustrato para las cinéticas sin y con probiótico del experimento dos.

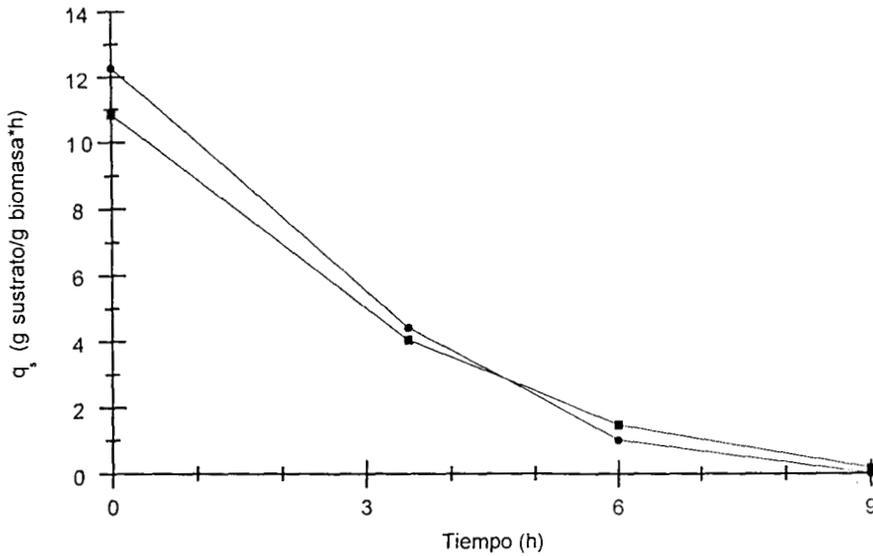


Fig. 6.3.4. Comparación de las tasas específicas de consumo de sustrato sin probiótico (■) y con probiótico (●) en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 8 g/L.

Los resultados presentados en la Figura 6.3.4., confirman que la adición de probiótico proporciona a *M. elsdenii* una mayor eficiencia para consumir sustrato, ya que son muy similares a los presentados en la Figura 6.2.3., a pesar de la diferencia en la concentración inicial de sustrato.

6.3.3. Cinética de formación de producto

Para la formación de producto, sin probiótico y con probiótico, en el presente experimento, se presentan los resultados a continuación, en la Figura 6.3.5.

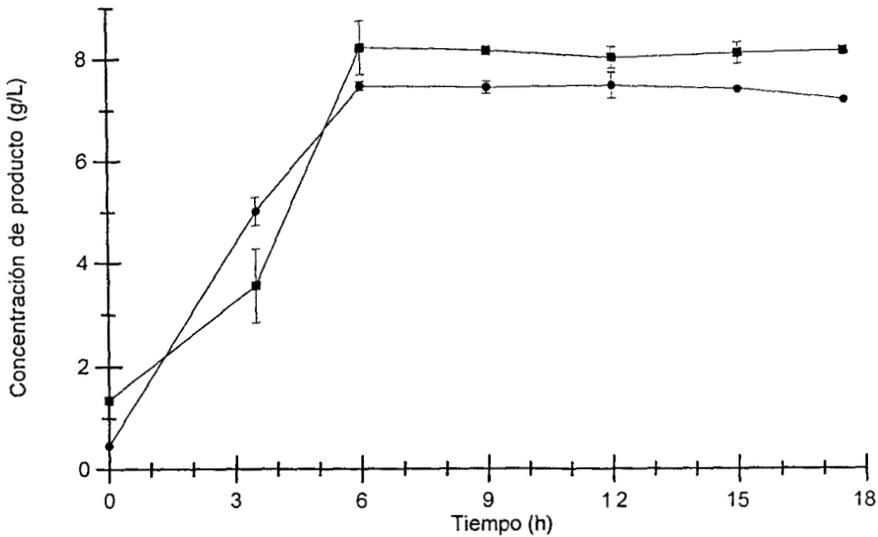


Fig. 6.3.5. Comparación de las cinéticas de formación de producto sin probiótico (■) y con probiótico (●) en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 8 g/L.

En este caso las diferencias en los resultados, son más claras que en la Figura 6.2.5., sin dejar de ser perfiles muy similares, pues se nota inmediatamente que el probiótico estimula la formación de producto por parte de *M. elsdenii*, aunque finalmente la concentración al término de la fase de crecimiento, es menor que en el caso sin probiótico, lo cual confirma los resultados obtenidos anteriormente. Al igual que en el caso anterior, se aprecia que la formación de producto inicia y termina con la fase de crecimiento.

La siguiente figura, presenta la comparación de las tasas específicas de formación de producto, sin y con probiótico.

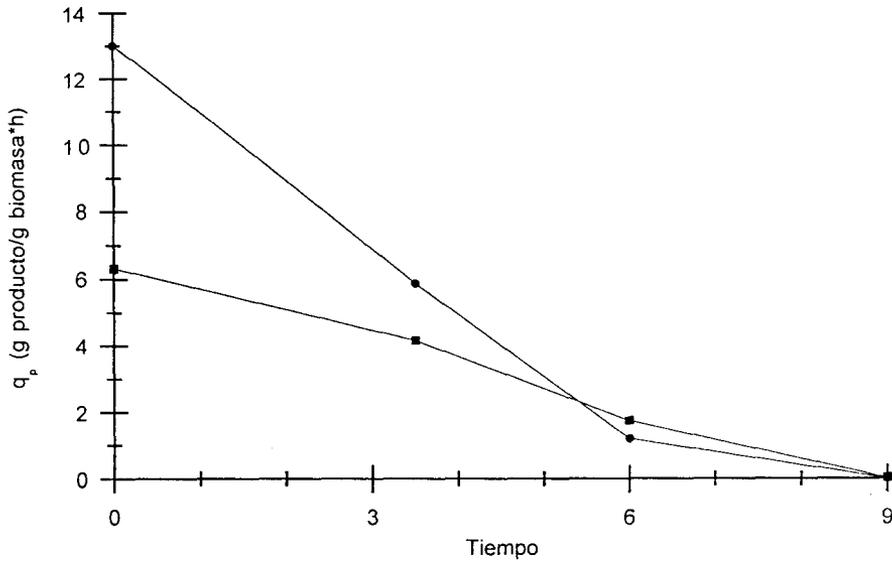


Fig. 6.3.6. Comparación de las tasas específicas de formación de producto sin probiótico (■) y con probiótico (●) en cultivo por lote, con concentración inicial de sustrato de 8 g/L.

La Figura 6.3.6. confirma que el probiótico estimula la capacidad de *M. elsdenii* para formar producto, sobre todo al inicio de la fase de crecimiento, cuando la tasa específica de crecimiento es alta.

Al igual que en el experimento anterior, se concluye el análisis de resultados presentando la estimación de parámetros del modelo, que puede hacerse directamente de los resultados experimentales.

$Y_{X/S}$ sin probiótico	0.073 g biomasa/g sustrato
$Y_{X/S}$ con probiótico	0.084 g biomasa/g sustrato
$Y_{P/X}$ sin probiótico	11.87 g producto/g biomasa
$Y_{P/X}$ con probiótico	10.72 g producto/g biomasa
K_d sin probiótico	0.0127 h ⁻¹
K_d con probiótico	0.0145 h ⁻¹

Los resultados de la estimación de parámetros, que puede hacerse directamente de datos experimentales muestra que, de manera similar que en el experimento anterior, el probiótico incrementa en un 15% el valor del coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato, lo cual indica un uso más eficiente de la fuente de carbono, por parte del microorganismo. Una consecuencia de lo anterior, es que el coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa se ve disminuido en un 9.7%, ya que se puede formar una menor cantidad de producto, pues se utiliza más fuente de carbono para formar biomasa. La constante de muerte, no presenta, una vez más, cambios importantes. Al comparar los correspondientes valores de $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ y K_d obtenidos en ambos experimentos, se puede afirmar que, a pesar de la diferencia en la concentración inicial de sustrato, en el experimento uno se inició con una concentración de sustrato 50% más alta, los resultados son muy similares.

6.4. Efecto de la edad del inóculo

En seguida se presentan los resultados obtenidos, al llevar a cabo las cinéticas sin probiótico y con probiótico con una concentración inicial de sustrato de aproximadamente 10 g/L, en las mismas condiciones, pero con un inóculo que ha sufrido un periodo de estrés; el estrés, que fue mantenerlo en refrigeración, a +4°C durante 15 días, dejándolo envejecer. Las cinéticas son comparadas con las correspondientes al experimento anterior, ya que en ambos casos solo se tienen cinéticas sin y con probiótico.

6.4.1. Cinética de crecimiento

La Figura 6.4.1., muestra las cinéticas de biomasa sin y con probiótico, para los experimentos con inóculo fresco y con inóculo viejo. Nuevamente se presentan los resultados normalizados, es decir, cada concentración ha sido dividida entre la concentración máxima de biomasa observada en cada experimento.

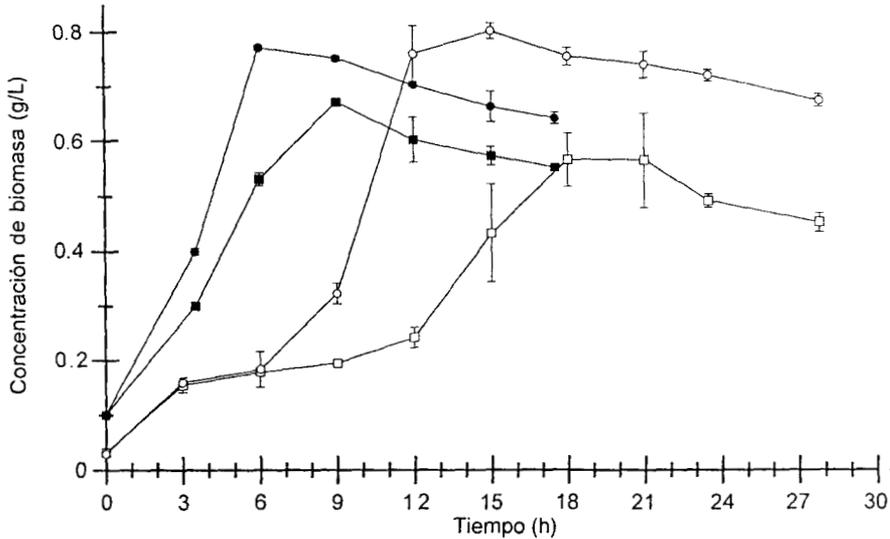


Fig. 6.4.1. Comparación de las cinéticas de crecimiento de *M. eldenii*, sin probiótico (■) y con probiótico (●) con inóculo fresco y concentración inicial de sustrato de 8 g/L contra las cinéticas sin probiótico (□) y con probiótico (○) con inóculo viejo y concentración inicial de sustrato de 10 g/L, en cultivo por lote.

En la figura 6.4.1., es notorio que el efecto de la presencia del probiótico es más marcado, cuando se ha utilizado un inóculo viejo, cuyas células probablemente presenten algún tipo de daño. Las cinéticas con inóculo fresco ya has sido descritas, para las cinéticas con inóculo viejo se observa que, en presencia del probiótico, el crecimiento inicia en un tiempo más corto, además de observarse una mayor pendiente durante la fase exponencial, lo que indica mayor velocidad de crecimiento. Un detalle importante más, es que la diferencia en las concentraciones máximas de biomasa es mayor que con el inóculo fresco.

6.4.2. Cinética de consumo de sustrato

El comportamiento observado para la formación de biomasa, concuerda con el consumo de sustrato, como se puede observar en la Figura 6.4.2., que presenta la comparación de las cinéticas de consumo de sustrato.

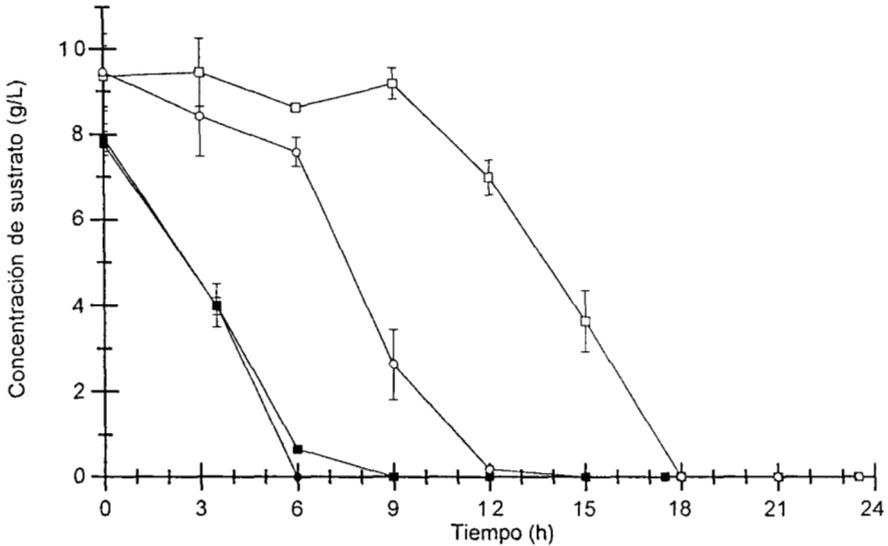


Fig. 6.4.2.. Comparación de las cinéticas de consumo de sustrato, sin probiótico (■) y con probiótico (●) con inóculo fresco y concentración inicial de sustrato de 8 g/L, contra las cinéticas sin probiótico (□) y con probiótico (○) con inóculo viejo y concentración inicial de sustrato de 10 g/L, en cultivo por lote.

La Figura 6.4.2., muestra resultados para las cinéticas con inóculo viejo que, como ya se mencionó, concuerdan con los resultados de las cinéticas de crecimiento, pues el consumo efectivo del sustrato comienza al iniciarse el crecimiento, y concluye al mismo tiempo en que se alcanza la concentración máxima de biomasa, en ambos casos. En este caso también se observa que el probiótico estimula la capacidad de *M. elsdenii*, para asimilar el sustrato, ya que la concentración de este comienza a disminuir en el medio, de manera notoria, entre tres y seis horas antes en presencia de probiótico. Al comparar con las cinéticas con inóculo fresco, se observa que, en el caso de las cinéticas con inóculo viejo, el efecto del probiótico es más notorio.

6.4.3. Cinética de formación de producto

Para concluir la presentación y discusión de los resultados experimentales del presente documento, se presenta a continuación la Figura 6.4.3., en la que se compara las cinéticas de formación de producto sin y con probiótico, con inóculo viejo, con las correspondientes cinéticas con inóculo fresco.

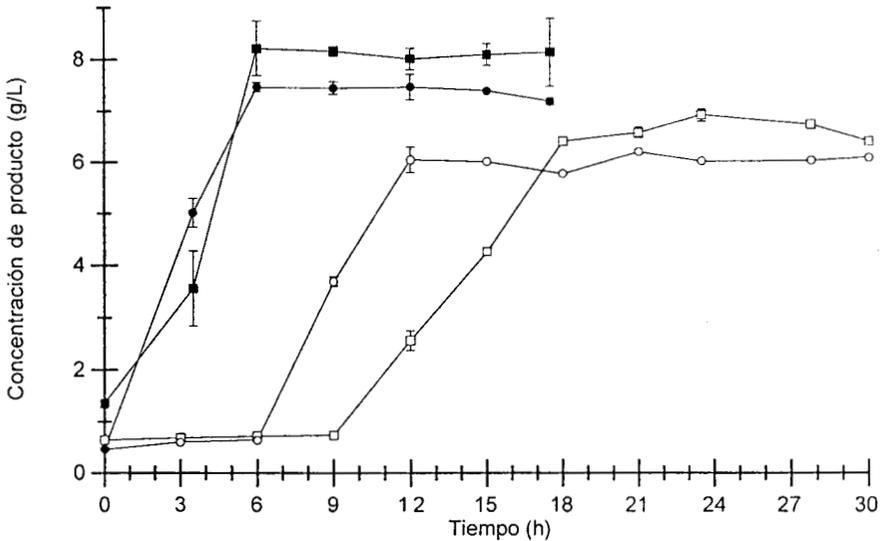


Fig. 6.2.18. Comparación de las cinéticas de formación de producto, sin probiótico (■) y con probiótico (●) con inóculo fresco y concentración inicial de sustrato de 8 g/L, contra las cinéticas sin probiótico (□) y con probiótico (○) con inóculo viejo y concentración inicial de sustrato de 10 g/L, en cultivo por lote.

En la Figura 6.2.18., puede observarse que, para el caso del experimento con inóculo viejo, en presencia de probiótico la formación de producto es iniciada en menor tiempo, debido a que también el crecimiento inicia en un tiempo menor. Sin embargo, se aprecia el mismo comportamiento que en el caso de cinéticas que se inocularon con células jóvenes, de obtener una concentración final de producto mayor, en la cinética sin probiótico. En general, el efecto de la edad del inóculo es agudizar las diferencias entre cinéticas sin y con probiótico.

De manera similar a la empleada en los experimentos pasados, se concluye el análisis de resultados del presente experimento, con los resultados de la estimación de parámetros del modelo, que puede hacerse directamente de los resultados experimentales.

$Y_{X/S}$ sin probiótico	0.04 g biomasa/g sustrato
$Y_{X/S}$ con probiótico	0.081 g biomasa/g sustrato
$Y_{P/X}$ sin probiótico	15.84 g producto/g biomasa
$Y_{P/X}$ con probiótico	7.22 g producto/g biomasa
K_d sin probiótico	0.0125 h ⁻¹
K_d con probiótico	0.0131 h ⁻¹

La estimación de parámetros, para el experimento tres, muestra que el coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato, presenta un incremento de 102.5%, mucho mayor al obtenido en los experimento anteriores, es decir, que al utilizar inóculo viejo, el efecto del probiótico es mucho más notorio. Para el caso del coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa, se observa una caída de un 54.4% al adicionar probiótico, ya que una cantidad mayor de sustrato se utilizó en formar biomasa. Finalmente, se puede observar que el probiótico no influye en la fase de muerte, aún cuando se trabaja con inóculo viejo, pues las constantes de muerte no difieren de las obtenidas en los experimentos con inóculo fresco.

MODELADO MATEMATICO

7. Modelado matemático

En este capítulo, se parte del modelo matemático desarrollado en el capítulo 5, y se discute cómo los resultados experimentales permiten darle soporte y modificarlo donde se requiere. A continuación, se presentan los resultados del ajuste de los parámetros, que no pueden ser estimados directamente de los datos experimentales, y cómo esto da lugar a sugerir modificaciones, que resultarán en una propuesta final para el modelo. En seguida, se adimensiona el modelo y se presentan las simulaciones numéricas, comparadas con los datos experimentales normalizados.

El capítulo concluye retomando los resultados experimentales y de modelamiento, para elaborar una discusión del conjunto de ellos, y proponer una explicación, hasta donde los mismos resultados permiten llegar, del beneficio que recibe el rumiante, al estimular su microflora consumidora de ácido láctico, con la adición de un probiótico.

7.1. El Modelo

En la sección 5.3. de presente documento, se desarrolló un modelo matemático para el cultivo por lotes de *Megasphaera elsdenii*, siguiendo las hipótesis propuestas en la sección 5.2.; las ecuaciones del modelo son las siguientes:

$$\text{Para concentración de biomasa (} X \text{)} \quad \frac{dX}{dt} = \mu X \quad X(0) = X_0 \quad (5.3.-4)$$

$$\text{Para concentración de sustrato (} S \text{)} \quad \frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} + mX \quad S(0) = S_0 \quad (5.3.-8)$$

$$\text{Para concentración de producto (} P \text{)} \quad \frac{dP}{dt} = \alpha\mu X + \beta X \quad P(0) = P_0 \quad (5.3.-12)$$

$$\text{Donde el modelo celular es:} \quad \mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (7.1.-1)$$

Sin embargo, a ellas se deben incorporar las observaciones de los experimentos previamente presentados o, en su caso, mediante las evidencias experimentales, justificar el que un término, una ecuación o el modelo completo, permanezcan en su forma original. La primera modificación que evidentemente proponen los datos experimentales, es la de incluir un término de muerte, en la ecuación del modelo celular, del cual incluso se ha estimado su valor para cada cinética.

Por otra parte, si se considera la ecuación (5.3.-8) y se divide entre la concentración de biomasa, se obtiene:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \quad (7.1.-2)$$

Si se grafica la tasa específica de crecimiento (μ), contra la tasa específica de consumo de sustrato (q_s), para los datos experimentales, se obtiene una regresión lineal de los puntos, el inverso de la pendiente es el coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato y la ordenada al origen, proporciona el valor del coeficiente de mantenimiento. A continuación en la Figura 7.1.1., se presenta una gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato.

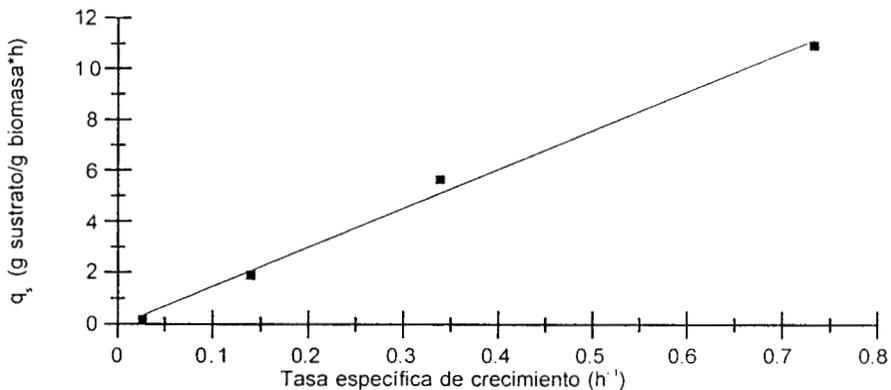


Fig. 7.1.1. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética con concentración inicial de sustrato de 12 g/L, sin probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 15.26\mu - 0.07$ con $R^2 = 0.994$.

En la Figura 7.1.1. se observa, que los puntos experimentales se ajustan muy bien a una línea recta, ya que el coeficiente de correlación es muy cercano a la unidad, sin embargo, la observación más importante que se puede extraer de la gráfica, es que el valor de la ordenada al origen es muy pequeña, comparada con el valor de la pendiente, lo que significa que no existe mantenimiento, pudiéndose despreciar el término correspondiente, en la ecuación (5.3.-8). Un comportamiento similar se obtiene, al aplicar el mismo análisis a las demás cinéticas de los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo. Las gráficas se pueden consultar en el apéndice tres, al final del documento.

Por otra parte, la pendiente de la recta, es un estimado del inverso del coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato ($Y_{X/S}$), según el cual, $Y_{X/S}$ tiene un valor de 0.0655 g biomasa/g sustrato, comparable al determinado directamente de los datos experimentales, 0.072 g biomasa/g sustrato. Sin embargo, en este trabajo se prefiere tomar el valor estimado directamente de datos experimentales, que no es producto de un ajuste.

A continuación, se considera la ecuación (5.3.-12), la cual postula que la formación de producto es debida a dos contribuciones, el primer término del lado derecho indica producción ligada al crecimiento, y formación de producto no ligada al crecimiento, que es lo que expresa al segundo término del lado derecho, y se divide entre la concentración de biomasa, se obtiene:

$$q_p = \alpha\mu + \beta \quad (7.1.-3)$$

Es decir, que si se grafica la tasa específica de crecimiento (μ), contra la tasa específica de formación de producto (q_p), para los datos experimentales y se obtiene una regresión lineal de los puntos, la pendiente de la recta será la contribución del crecimiento, mientras la ordenada al origen proporcionará la contribución no asociada al crecimiento. A continuación en la Figura 7.1.2., se presenta una gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato.

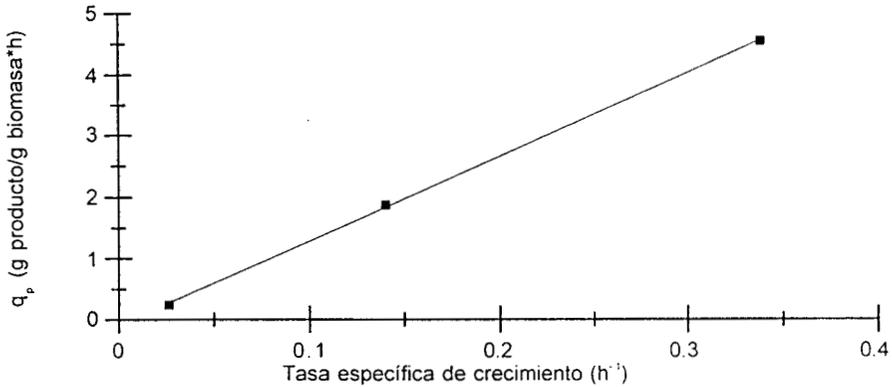


Fig. 7.1.2. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto para la cinética, con concentración inicial de sustrato de 12 g/L, sin probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_p = 13.72\mu - 0.095$ con $R^2 = 0.999$.

La Figura 7.1.2. muestra que los puntos experimentales de la tasa específica de crecimiento, contra la tasa específica de formación de producto, se ajustan muy bien a una línea recta, ya que el coeficiente de correlación es muy cercano a la unidad. Al encontrarse un valor muy pequeño de la ordenada al origen, comparado con el valor de la pendiente, se puede afirmar que la formación de producto por *Megaspheera elsdenii*, a partir de ácido láctico, está totalmente ligada al crecimiento. La pendiente de la recta de regresión, es un estimado del coeficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa, sin embargo, igual que en el caso anterior, se prefiere el valor determinado directamente de datos experimentales.

El hecho de que la formación de producto en *M. elsdenii*, esté ligada al crecimiento, concuerda muy bien con lo encontrado en la literatura, ya que el producto formado por este microorganismo (los ácidos acético, propiónico y butírico), forman parte de su metabolismo energético (Hino y Kuroda, 1993), y la formación de este tipo de productos, siempre se ha encontrado ligada al crecimiento (Blanch, 1981). El mismo comportamiento fue encontrado en las demás cinéticas, las figuras correspondientes, se pueden consultar en el apéndice cuatro, al final del documento.

Una vez incorporadas las observaciones experimentales, a continuación se presentan las ecuaciones del modelo modificado, en las cuales se eliminaron los términos de mantenimiento (en la ecuación para el sustrato), el término de formación de producto no asociado al crecimiento (en la ecuación para el producto) y en lo que corresponde al modelo celular, se incorporó el término de muerte.

$$\text{Para concentración de biomasa (X)} \quad \frac{dX}{dt} = \mu X \quad X(0) = X_0 \quad (7.1.-4)$$

$$\text{Para concentración de sustrato (S)} \quad \frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad S(0) = S_0 \quad (7.1.-5)$$

$$\text{Para concentración de producto (P)} \quad \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \mu X \quad P(0) = P_0 \quad (7.1.-6)$$

$$\text{Donde el modelo celular es:} \quad \mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - K_d \quad (7.1.-7)$$

Obsérvese que al no considerar formación de producto no asociada al crecimiento, la variable α , en la ecuación para el producto, se ha cambiado por $Y_{P/X}$, que es más comúnmente utilizada.

7.2. Ajuste de parámetros

Se conocen ya los valores de los parámetros $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$, y K_d , que corresponden a los casos sin y con probiótico, ya que fueron estimados directamente de los datos experimentales, sin embargo, para determinar los valores de μ_{\max} y K_S , los cuales no pueden ser estimados directamente de los datos experimentales; se debe realizar por ajuste a los datos experimentales. El ajuste se llevó a cabo siguiendo la metodología presentada en la sección 4.7., del presente documento que consistió en proponer valores de μ_{\max} y K_S , siguiendo un diseño experimental tipo simplex-centróide, para realizar simulaciones numéricas y posteriormente comparar las predicciones con los datos experimentales. Los valores de μ_{\max} y K_S que corresponden al mejor ajuste, son aquellos para los

cuales se minimizan las funciones índice de desempeño (4.7.-4) y chi cuadrada (4.7.-5). Como muestra, se presenta a continuación, en la Fig. 7.2.1., la gráfica de las curvas de nivel, correspondientes a la superficie de respuesta generada para la función índice de desempeño, en la cinética sin probiótico y concentración inicial de sustrato de 12 g/L. Las gráficas de curvas de nivel correspondientes a las demás cinéticas llevadas a cabo, se pueden consultar en el apéndice cinco, al final del documento.

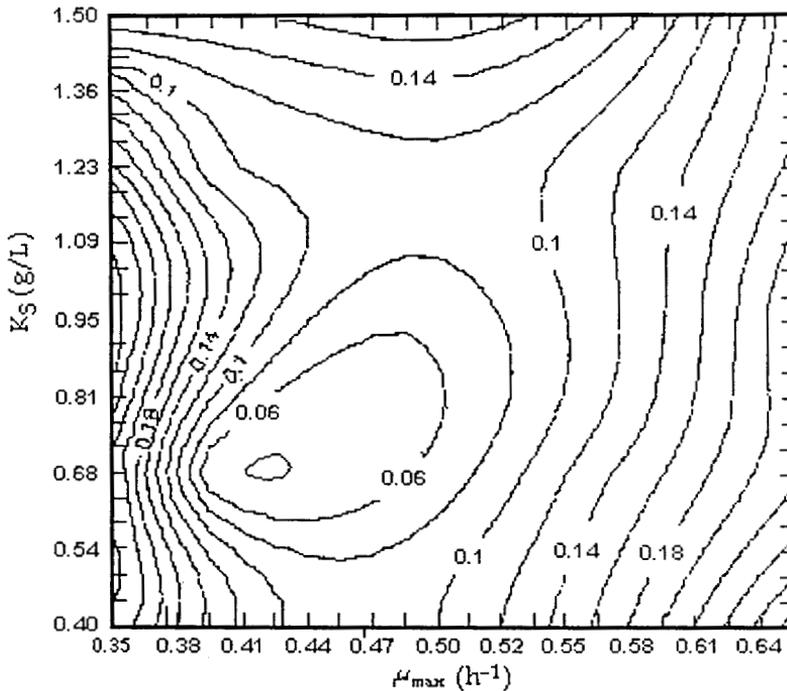


Fig. 7.2.1. Curvas de nivel para el ajuste de parámetros, correspondiente a la cinética sin probiótico y concentración inicial de sustrato de 12 g/L. El mínimo corresponde a los valores de $\mu_{\max} = 0.421 \text{ h}^{-1}$ y $K_S = 0.69 \text{ g/L}$, con valor de $J = 0.043$.

En la figura anterior se puede apreciar el mínimo de la función índice de desempeño, que corresponde al par de valores μ_{\max} y K_S , que corresponden al mejor ajuste, para los datos experimentales.

Para el caso de las cinéticas en que se utilizó inóculo fresco, se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan en la Tabla 7.2.1.

Tabla 7.2.1. Resultados del ajuste de parámetros del modelo, para las cinéticas llevadas a cabo con inóculo fresco. μ_{\max} tiene unidades de h^{-1} , y K_S tiene unidades de g/L.

	Sin probiótico		Con probiótico		Promedios		Diferencia
	$S_0=12$ g/L	$S_0=8$ g/L	$S_0=12$ g/L	$S_0=8$ g/L	Sin	Con	
μ_{\max}	0.42	0.44	0.53	0.58	0.43	0.56	+30.2%
K_S	0.69	0.68	0.68	0.70	0.69	0.69	-

Como puede apreciarse en la tabla anterior, la presencia del probiótico únicamente cambia el valor de μ_{\max} , pero no el de K_S . El valor de μ_{\max} se ve incrementado en un 30% con la adición del probiótico.

Para el caso de las cinéticas en que se utilizó inóculo viejo, los resultados se presentan en la Tabla 7.2.2.

Tabla 7.2.2. Resultados del ajuste de parámetros del modelo, para las cinéticas llevadas a cabo con inóculo viejo. μ_{\max} tiene unidades de h^{-1} , y K_S tiene unidades de g/L.

	Sin probiótico	Con probiótico	Diferencias
μ_{\max}	0.19	0.40	+112.8%
K_S	0.75	0.70	-6.7%

La Tabla 7.2.2. muestra que, al igual que en el caso anterior, al utilizar inóculo viejo y probiótico, el efecto de este último, se da principalmente sobre la tasa específica máxima de crecimiento, y en una proporción mucho mayor, ya que en este caso, la presencia del probiótico incrementa en más de un 100% el valor de μ_{\max} . Por otra parte, el efecto del probiótico sobre la constante de afinidad, es muy pequeño y se puede considerar despreciable, en comparación con el efecto sobre μ_{\max} ; además de que los valores de K_S prácticamente no difieren de los obtenidos en las cinéticas en que se utilizó inóculo fresco.

Los resultados anteriores, indican que no es necesario proponer un modelo que contemple cambios en la constante de afinidad; y ya que el cambio importante que se da en los parámetros cinéticos del cultivo, con la presencia del probiótico, es sobre μ_{\max} , se hace necesario postular un modelo celular que contemple modificaciones de dicho parámetro.

El modelo que proponen Tsao y Hanson (1975), para el caso en que se encuentren en el medio sustratos esenciales y sustratos mejoradores del crecimiento (vitaminas, cofactores, etc.), es el siguiente:

$$\mu = \left(1 + \sum_i \frac{k_i S'_i}{K'_i + S'_i} \right) \left(\mu_{\max} \frac{S_j}{K_{S_j} + S_j} \right) \quad (7.2.-1)$$

donde:

- S_j sustratos esenciales para el crecimiento
- S'_i sustratos mejoradores de la tasa de crecimiento

Es un modelo en el cual la presencia de sustratos que mejoran el crecimiento, afecta a la tasa específica máxima de crecimiento, incrementándola; mejor dicho, incrementando al producto de las tasas específicas máximas de crecimiento, debidas a cada uno de los sustratos esenciales, se modela con una expresión que suma términos de saturación, tipo Monod, para cada uno de los sustratos mejoradores del crecimiento. Para el caso de este trabajo, en que sólo se tiene un sustrato esencial, que es el ácido láctico, y un sustrato mejorador del crecimiento, que es el probiótico, la ecuación se reduce a:

$$\mu = \left(1 + \frac{kB}{K_B + B} \right) \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (7.2.-2)$$

donde:

- μ tasa específica de crecimiento, en h^{-1}
- k factor máximo de mejoramiento de μ (adimensional)
- B concentración de probiótico, en g/L
- K_B constante de afinidad del probiótico, en g/L

μ_{\max}	tasa específica de crecimiento máxima sin probiótico, en h^{-1}
S	concentración de sustrato, en g/L
K_S	constante de afinidad del sustrato, en g/L

Para la ecuación anterior se pueden considerar siguientes casos límite:

a) si $B \gg K_B$, entonces la ecuación (7.2.-2) se reduce a:

$$\mu = (1 + k) \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (7.2.-3)$$

Donde, dados los resultados de éste trabajo, $k = 0.302$.

b) si $B \ll K_B$, entonces la ecuación (7.2.-2) se reduce a:

$$\mu = (1 + \lambda B) \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (7.2.-4)$$

donde:

$$\lambda = k/K_B$$

con unidades de $(g/L)^{-1}$, que por los resultados ya presentados y, dada la concentración de probiótico utilizada (0.675 g/L), tiene un valor de $\lambda = 0.447 \text{ L/g}$.

Este caso límite resulta más interesante, ya que la ecuación (6.3.-12) puede responder a las dos situaciones que se pueden presentar; cuando el probiótico está presente se utiliza la ecuación (6.3.-12) como tal, mientras que si no existe probiótico en el medio $B = 0$ y se recupera el modelo de Monod, que describe el cultivo sin probiótico.

Dados los resultados experimentales y de ajuste de parámetros, el modelo que se obtiene en el presente trabajo, incorporando el modelo celular a las ecuaciones, es el siguiente:

$$\frac{dX}{dt} = \left[(1 + \lambda B) \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - K_d \right] X \quad X(0) = X_0 \quad (7.2.-5)$$

$$\frac{dS}{dt} = \left[(1 + \lambda B) \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - K_d \right] \frac{X}{Y_{X/S}} \quad S(0) = S_0 \quad (7.2.-6)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left[(1 + \lambda B) \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - K_d \right] Y_{P/X} X \quad P(0) = P_0 \quad (7.2.-7)$$

En un modelo no estructurado, no segregado, ya que ignora la estructura interna de las células, tomando a la biomasa como formada por células idénticas (sin segregación). De hecho, la biomasa se considera como una especie más, en solución.

7.3. Simulación de cinéticas

En esta sección se presentarán, en forma de gráficas, comparaciones de los datos experimentales, contra las simulaciones numéricas de las correspondientes cinéticas, con el objeto de mostrar cómo el modelo representa los datos experimentales. Para ello, se comenzará con un proceso para adimensionalizar el modelo, ya que los datos experimentales con los que se compara, son los datos normalizados.

En las ecuaciones (7.2.-5) a (7.2.-7), el término $(1 + \lambda B) \mu_{\max}$, se puede considerar como una tasa específica máxima de crecimiento aparente, es decir:

$$(1 + \lambda B) \mu_{\max} = \mu_{m,app} \quad (7.3.-1)$$

y por lo tanto, las ecuaciones (7.2.-5) a (7.2.-7) se pueden reescribir como:

$$\frac{dX}{dt} = \left[\mu_{m,app} \frac{S}{K_S + S} - K_d \right] X \quad X(0) = X_0 \quad (7.3.-2)$$

$$\frac{dS}{dt} = \left[\mu_{m,app} \frac{S}{K_S + S} - K_d \right] \frac{X}{Y_{X/S}} \quad S(0) = S_0 \quad (7.3.-3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left[\mu_{m,app} \frac{S}{K_S + S} - K_d \right] Y_{P/X} X \quad P(0) = P_0 \quad (7.3.-4)$$

Si se definen las siguientes variables adimensionales:

$$\begin{aligned} t^* &= t \mu_{m,app} \\ X^* &= \frac{X}{X_{max}} \\ S^* &= \frac{S}{S_{max}} \\ P^* &= \frac{P}{P_{max}} \end{aligned}$$

donde:

X_{max}	Concentración de biomasa máxima observada
S_{max}	Concentración de sustrato máxima observada
P_{max}	Concentración de producto máxima observada

se despejan las correspondientes variables dimensionales, y se sustituyen en las ecuaciones (7.3.-2) a (7.3.-4), se obtiene el siguiente modelo adimensional:

$$\frac{dX^*}{dt^*} = \left[\frac{S^*}{K_S^* + S^*} - K_d^* \right] X^* \quad X^*(0) = X_0^* \quad (7.3.-5)$$

$$\frac{dS^*}{dt^*} = \left[\frac{S^*}{K_S^* + S^*} - K_d^* \right] Y_{X/S}^* X^* \quad S^*(0) = S_0^* \quad (7.3.-6)$$

$$\frac{dP^*}{dt^*} = \left[\frac{S^*}{K_S^* + S^*} - K_d^* \right] Y_{P/S}^* X^* \quad P^*(0) = P_0^* \quad (7.3.-7)$$

donde:

$$K_S^* = \frac{K_S}{S_{max}} \quad \text{constante adimensional de afinidad}$$

$$K_d^* = \frac{K_d}{\mu_{m,app}} \quad \text{constante adimensional de muerte}$$

$$Y_{X/S}^* = \frac{X_{max}}{S_{max} Y_{X/S}} \quad \text{coeficiente adimensional de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato}$$

$$Y_{P/X}^* = \frac{X_{max} Y_{P/X}}{P_{max}} \quad \text{coeficiente adimensional de rendimiento de producto con respecto a biomasa}$$

Utilizando el modelo adimensional, constituido por las ecuaciones (7.3.-5) a (7.3.-7), se llevaron a cabo las simulaciones numéricas para construir las curvas presentadas a continuación. La Figura 7.3.1. que aparece a continuación, muestra la comparación de los datos experimentales contra los datos que predice el modelo.

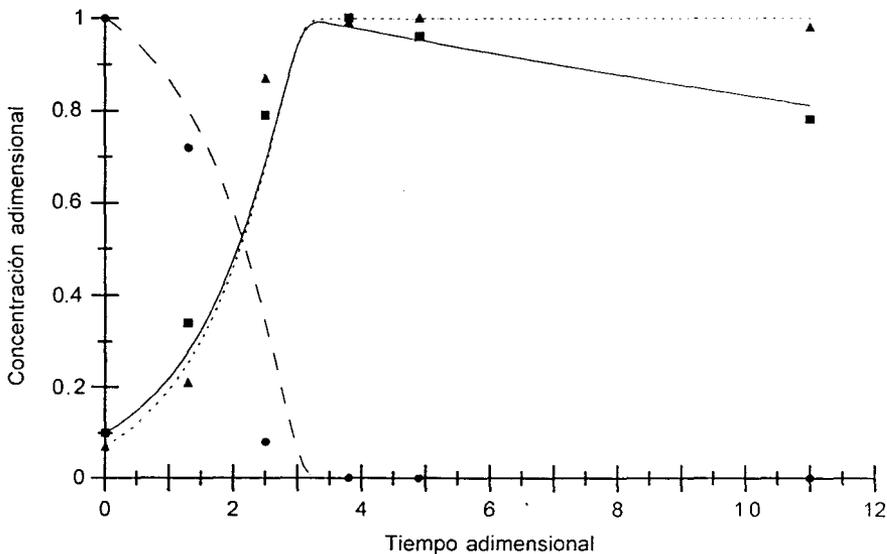


Fig. 7.3.1. Comparación de las cinéticas experimentales de concentración adimensional de biomasa (■), sustrato (●) y producto (▲), contra las simulaciones numéricas correspondientes; biomasa (línea continua), sustrato (línea a trazos largos) y producto (línea a trazos cortos), para el experimento sin probiótico y con concentración inicial de sustrato de 12 g/L, utilizando inóculo fresco. Los valores de las funciones objetivo, para este ajuste son: $J = 0.043$ y $\chi^2 = 3.51$

En la Figura 7.3.1., se presenta el mejor ajuste global que el modelo proporciona para los datos experimentales, en el experimento realizado sin probiótico, con inóculo fresco y una concentración inicial de sustrato de 12 g/L. Los valores de J y χ^2 corresponden a los mínimos de ambas funciones, con lo cual se obtienen los valores de $\mu_{\max} = 0.421\text{h}^{-1}$ y $K_S = 0.69\text{g/L}$. Los valores ajustados para los parámetros de la ecuación de Monod, son comparables a los obtenidos para otros microorganismos anaerobios (Blanch y Clark, 1994).

A continuación, la Figura 7.3.2. presenta el mejor ajuste global que el modelo proporciona, para los datos experimentales de la cinética realizada con probiótico, inóculo fresco y concentración inicial de sustrato de 12 g/L.

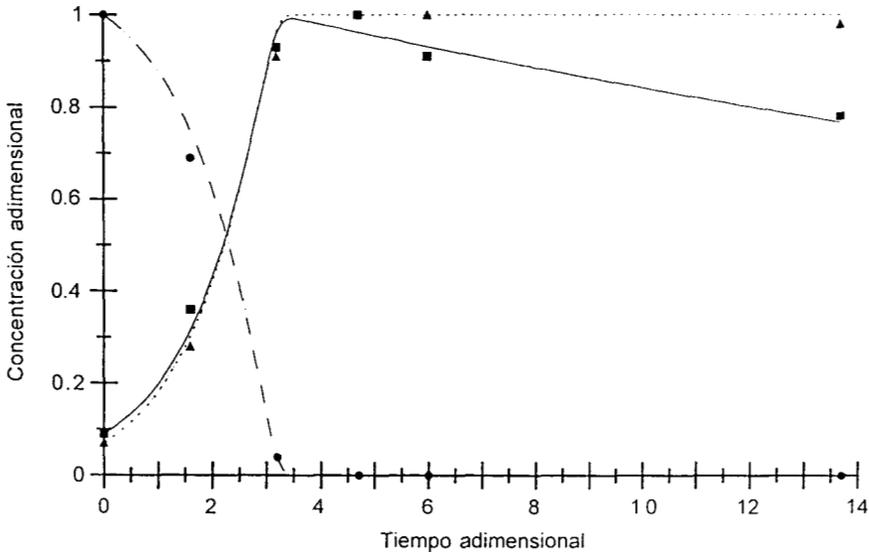


Fig. 7.3.2. Comparación de las cinéticas experimentales de concentración adimensional de biomasa (■), sustrato (●) y producto (▲), contra las simulaciones numéricas correspondientes; biomasa (línea continua), sustrato (línea a trazos largos) y producto (línea a trazos cortos), para el experimento con probiótico y con concentración inicial de sustrato de 12 g/L, utilizando inóculo fresco. Los valores de las funciones objetivo, para este ajuste son: $J = 0.017$ y $\chi^2 = 0.039$

Los valores de J y χ^2 corresponden a los mínimos de ambas funciones, con lo cual se obtienen los valores de $\mu_{\max} = 0.525\text{h}^{-1}$ y $K_S = 0.68\text{g/L}$. Estos valores

también son comparables, a los obtenidos para otros microorganismos anaerobios (Blanch y Clark, 1994). Las figuras correspondientes a las demás cinéticas llevadas a cabo se pueden consultar en el apéndice cinco, al final del documento.

7.4. Cultivo continuo de *Megasphaera elsdenii*

Se consideró necesario realizar un experimento en cultivo continuo, para intentar explorar la aplicabilidad del modelo al cambiar de régimen de cultivo. A continuación se presentan los resultados correspondientes. El experimento duró 185 horas, de las cuales, las primeras 18 horas se operó en cultivo por lote. La etapa de cultivo continuo se dividió en dos partes; en la primera de ellas, se alimentó medio de cultivo sin probiótico, a una tasa de dilución de 0.1 h^{-1} , mientras que en la segunda, se alimentó medio de cultivo con probiótico (*Yea Sacc 1026*) en concentración de 0.675 g/L . Los resultados se presentan en las tres siguientes figuras, en la Figura 7.4.1. se presentan los resultados correspondientes a la concentración de biomasa, a lo largo de la fermentación.

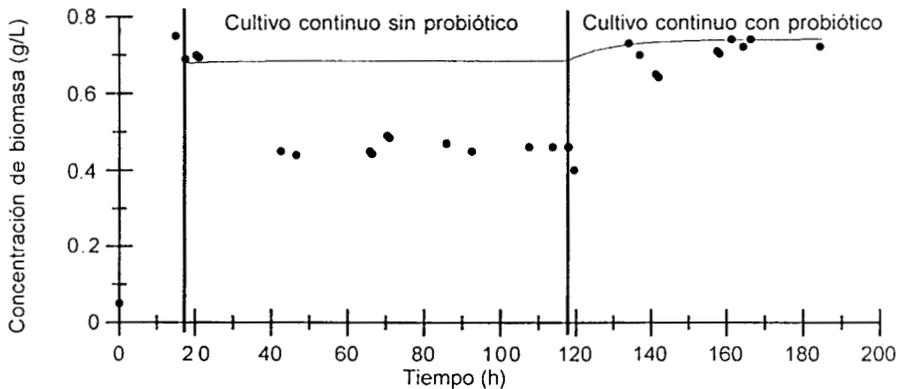


Fig. 7.4.1. Evolución de la concentración de biomasa (■) durante el experimento realizado en cultivo continuo y simulación numérica (línea continua).

La Figura 7.4.1., se aprecian tres etapas del cultivo, una etapa en régimen de lote que duró 18 horas, después de la cual se obtuvo una concentración de biomasa, comparable a la que se observó en los experimentos previamente presentados, y

se comenzó a alimentar medio de cultivo fresco. Siguen dos etapas de cultivo continuo, la primera de las cuales duró cien horas. Apartir de las 85 horas aproximadamente, se alcanzó una concentración de biomasa de alrededor de 0.45 g/L, de la cual no se observó un cambio apreciable durante 33 horas, por lo que se supuso haber alcanzado un estado estacionario.

A las 118 h se inyectó una solución de probiótico, en cantidad necesaria para alcanzar la concentración de probiótico en el medio de cultivo (0.675 g/L), que se comenzó a alimentar a partir de ese momento. Comienza entonces la segunda etapa del cultivo continuo, en la cual se observa que la concentración de biomasa aumenta, hasta alcanzar un nuevo estado estacionario alrededor de 0.73 g/L.

Si se observan las concentraciones de biomasa de los estados estacionarios alcanzados, se nota inmediatamente que el efecto del probiótico, es más importante en cultivo continuo que en cultivo en lotes, ya que en los experimentos anteriores la presencia del probiótico provocó aumentos de biomasa de entre un 10 y un 15% con inóculo fresco, hasta un 40% con inóculo viejo; mientras que en cultivo continuo el aumento en la concentración de biomasa es de aproximadamente un 60%, utilizándose inóculo fresco. A continuación, en la Figura 7.4.2., se presentan los resultados de este experimento en cuanto a concentración de sustrato.

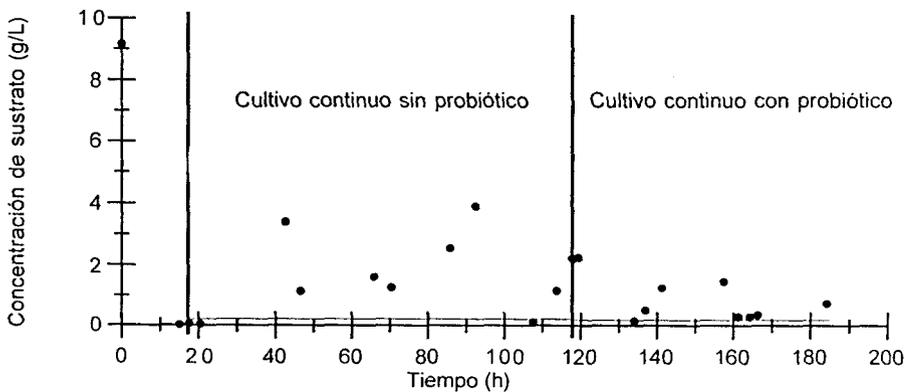


Fig. 7.4.2. Evolución de la concentración de sustrato (■) durante el experimento realizado en cultivo continuo y simulación numérica (línea continua).

En la figura anterior, se puede observar que la concentración de sustrato muestra un comportamiento similar, en cuanto a la tendencia, al observado por la concentración de biomasa, si bien la dispersión de los datos es mayor en el caso de la concentración de sustrato. En la primera etapa de cultivo continuo, se observa una tendencia de la concentración de sustrato, hacia estabilizarse en aproximadamente 1.95 g/L, es posible que faltara tiempo para que esto ocurriera, es decir, que si bien la concentración de biomasa alcanzó un estado estacionario, es posible que la concentración de sustrato no logró hacerlo.

En la segunda etapa del cultivo continuo, se observa también, comparado con la concentración de biomasa, mayor dispersión de datos, sin embargo se puede apreciar una tendencia hacia estabilizarse en aproximadamente en 0.69 g/L, valor menor que el correspondiente a la etapa anterior, lo cual concuerda con el hecho de que la concentración de biomasa, es mayor en la etapa con probiótico. Para concluir la presentación de resultados del experimento en cultivo continuo, se presentan a continuación, en la Figura 7.4.3., los resultados de la concentración de producto.

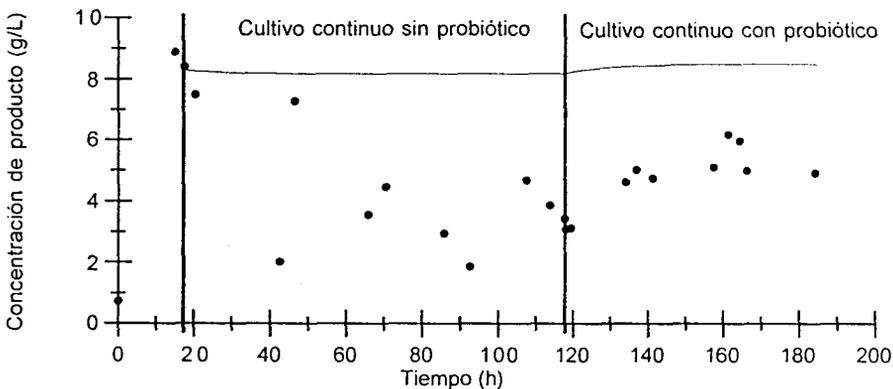


Fig. 7.4.3. Evolución de la concentración de producto (■) durante el experimento realizado en cultivo continuo y simulación numérica (línea continua).

Se aprecia en la Figura 7.4.3, que al igual que en el caso del sustrato, el comportamiento de la concentración de producto presenta una dispersión de datos mayor que en el caso de la concentración de biomasa; sin embargo, se

puede ver que, hay una tendencia hacia una concentración de producto de aproximadamente 3.74 g/L, para el caso de la etapa sin probiótico. Para la etapa con probiótico, se observa igualmente un tendencia hacia 5.27 g/L, presentando menor dispersión de datos; el que la tendencia con probiótico sea hacia una concentración mayor que sin probiótico, es congruente con el hecho de que la tendencia del sustrato es hacia una concentración menor, en la etapa con probiótico.

Es probable, que el cultivo no contó con el tiempo suficiente para alcanzar el estado estacionario, en ninguna de las dos etapas, ya que a pesar de que se observa que la concentración de biomasa se estabiliza, con muy poca variación, en las dos etapas, las concentraciones de sustrato y producto no lo han conseguido. Aun así, se marcan tendencias y es posible retomar el modelo matemático, desarrollado en la sección 5.4. del presente documento, eliminando los términos de mantenimiento y formación de producto no asociada a crecimiento, para llevar a cabo una simulación numérica, utilizando los valores de los parámetros determinados en cultivo por lote, y comparar con los datos experimentales.

En los tres casos puede verse que las predicciones del modelo no se aproximan a los datos experimentales. Es decir, el modelo matemático desarrollado, para cultivo continuo, utilizando los parámetros del cultivo por lotes, no es adecuado para describir los datos experimentales. Algunas de las razones, que se pueden proponer para justificar lo anterior, son:

- a) Es probable que el metabolismo de *Megasphaera elsdenii*, sea diferente en cultivo continuo. Experimentalmente se observó que al transcurrir el cultivo continuo, ya no se conserva la relación molar entre los ácidos grasos volátiles, que se observa en cultivo por lote (1:1:0.25, para acético, propiónico y butírico respectivamente). La producción de ácido propiónico cae rápidamente, mientras que la producción de ácido butírico se incrementa a la par. Lo anterior significa que ya no basta con modelar la formación de producto, con una sola ecuación; debe utilizarse una ecuación para cada producto; una posibilidad es

considerar un modelo estructurado, que contemple la dinámica interna de la célula.

- b) Es posible que el medio ambiente sea suficientemente diferente, como para cambiar la fisiología del microorganismo, por lo cual se comporta diferente. Ya no se agota el sustrato, el estado de óxido-reducción es diferente (las condiciones de anaerobiosis se mantienen con nitrógeno en lugar de CO₂), el sistema no se presuriza.
- c) Probablemente se de una distribución de tiempos de residencia en el flujo, lo cual no toma en cuenta el modelo propuesto, ya que éste considera mezclado ideal.

El considerar los aspectos anteriores, y formular un nuevo modelo para cultivo continuo, que describiera bien los datos experimentales, queda fuera del alcance del presente trabajo y es una propuesta para futuros estudios.

7.5. Discusión sobre resultados globales

En esta sección se recopilan los resultados obtenidos, para obtener una visión global del trabajo realizado y resumir sus implicaciones, tanto para el cultivo axénico de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*, como para el rumiante al que se le incorpora el probiótico comercial *Yen Sacc 1026*, en su dieta.

A continuación se presenta, en la Tabla 7.5.1., un resumen de los resultados obtenidos de la estimación y ajuste de parámetros, para las cinéticas en que se utilizó inóculo fresco.

Tabla 7.5.1. Resumen de resultados de la estimación y ajuste de parámetros de cinéticas con inóculo fresco. Las unidades de los parámetros son: $Y_{X/S}$, g biomasa/g sustrato, $Y_{P/X}$, g producto/g biomasa, K_d , h^{-1} , μ_{max} , h^{-1} y K_S g/L.

	Sin probiótico		Con probiótico		Promedios		Diferencia
	$S_0=12$ g/L	$S_0=8$ g/L	$S_0=12$ g/L	$S_0=8$ g/L	Sin	Con	
$Y_{X/S}$	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	+13.8%
$Y_{P/X}$	11.87	11.96	10.72	10.37	11.92	10.55	-11.5%
K_d	0.013	0.016	0.015	0.015	0.014	0.015	-
μ_{max}	0.44	0.42	0.58	0.53	0.43	0.55	+30.2%
K_S	0.68	0.69	0.70	0.68	0.69	0.69	-

En primer lugar, al comparar las columnas que presentan los resultados sin probiótico, para ambos experimentos, se nota que prácticamente no existen diferencias en los valores de los parámetros. Otro tanto se puede decir, de las columnas que presentan los resultados con probiótico; lo cual permite afirmar que el efecto del probiótico, no depende de la concentración inicial de sustrato, en el intervalo de 8 a 12 g/L. Este intervalo, puede marcar un rango de validez, tanto del efecto del probiótico, como del modelo.

Bajo el encabezado "promedios", se encuentran los resultados promediados sin probiótico en la columna de la izquierda y, los resultados promediados con probiótico en la de la derecha; en la última columna, se muestran los cambios en los parámetros, debidos a la adición de probiótico. La comparación de tales columnas, permite apreciar que los coeficientes de rendimiento, se ven modificados en proporciones muy similares, pero de signo contrario, lo que indica que el probiótico promueve un uso más eficiente del sustrato, por *M. elsdenii*, pues produce más biomasa y desecha menor cantidad de ácidos grasos volátiles, que los productos finales de su metabolismo energético (Hino y Kuroda, 1993).

Lo siguiente que salta a la vista, es el importante aumento (casi un 30%), que sufre la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}), lo que significa que el probiótico proporciona al microorganismo, una mayor capacidad de crecimiento, como se demostró al comparar, con y sin probiótico, la tasa específica de

crecimiento a lo largo de la fermentación; de hecho las diferencias que las gráficas mostraron, se deben al mayor valor que posee μ_{\max} , con probiótico.

Incluso las diferencias encontradas en los coeficientes de rendimiento, pueden deberse también al mayor valor de μ_{\max} , con probiótico; pues al iniciar la fermentación, cuando la concentración de sustrato es alta, la mayor capacidad de crecimiento que el probiótico promueve, permite que una fracción mayor del sustrato se aproveche para formar biomasa, lo que redundará en una mayor concentración de biomasa y menor concentración de producto, en el caso con probiótico y recuérdese que los coeficientes de rendimiento se calculan utilizando las concentraciones iniciales y finales.

Para finalizar el análisis de la Tabla 7.5.1., baste notar que el probiótico produce cambios despreciables en las constantes de afinidad (K_s) y muerte (K_d). Un comentario adicional, es que los valores de los parámetros obtenidos, son comparables a los que típicamente se encuentran, para microorganismos anaerobios, en la literatura (Blanch y Clark, 1994).

La Tabla 7.5.2., que aparece a continuación, resume los resultados de la estimación y ajuste de parámetros, para el experimento en que se utilizó inóculo viejo.

Tabla 6.5.2. Resumen de resultados de la estimación y ajuste de parámetros de cinéticas con inóculo viejo. Las unidades de los parámetros son: $Y_{X/S}$, g biomasa/g sustrato, $Y_{P/X}$, g producto/g biomasa, K_d , h^{-1} , μ_{\max} , h^{-1} y K_s g/L.

	Sin probiótico	Con probiótico	Diferencias
$Y_{X/S}$	0.04	0.11	+175%
$Y_{P/X}$	15.45	8.72	-44.95%
K_d	0.013	0.013	-
μ_{\max}	0.19	0.40	+112.8%
K_s	0.75	0.70	-

De la Tabla 7.5.2., se puede detallar un análisis que arrojará resultados similares a los ya comentados para la Tabla 6.5.1. La diferencia es, básicamente, que los

cambios en los parámetros del modelo, provocados por el probiótico, son de mayor magnitud. De este modo, el coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato se ve incrementado en un 175%, mientras el coeficiente de rendimiento de producto se ve disminuido en un 45% y la tasa específica máxima de crecimiento, aumenta su valor un 113% aproximadamente. Nuevamente, las constantes de afinidad y muerte no se ven afectadas.

Lo más relevante es, sin duda, que el efecto del probiótico se ve modificado en magnitud, más no en forma, por la edad del inóculo que se esté empleando. Esto es debido probablemente, a que las células que se encuentran en un inóculo viejo, presentan daños en su estructura, lo que provoca que se observen fases de retardo en el cultivo, como de hecho se observó, ya que se requiere tiempo para que los daños celulares sean reparados. De esta forma, el efecto de la edad del inóculo, es un aumento en la magnitud de los cambios que sufren los parámetros, debidos a la incorporación del probiótico al medio de cultivo.

Queda por establecer, el significado e implicaciones, del hecho de que aumente la capacidad de crecimiento de *Megasphaera elsdenii*, por efecto del probiótico. *Megasphaera elsdenii* es un microorganismo encontrado en rumiantes, con dietas basadas en granos (Stewart y Bryant, 1988), dietas que, al suministrar gran cantidad de materiales amiláceos, propician que el pH descienda por debajo de 6, por la producción de ácidos como el fórmico, succínico y, sobre todo, láctico (Hobson, 1966; Thomas y Rook, 1981). Para el rumiante, al que se le incorpora un probiótico a su dieta basada en granos, es benéfico que la microflora que consume ácido láctico, de la que *M. elsdenii* es el principal exponente (Counotte *et al.*, 1981), tenga una mayor capacidad de crecimiento y una mayor capacidad de consumo de ácido láctico, recuérdese que la tasa específica de consumo de sustrato aumenta al incorporar probiótico. Esto evitará que se acumule el ácido láctico y sus consecuencias.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las conclusiones más relevantes, que se pueden extraer de los resultados del presente trabajo son:

1. En términos globales, el efecto del probiótico comercial *Yea Sacc 1026*, sobre el cultivo sumergido por lotes de *Megasphaera elsdenii*, es la promoción de una mayor producción de biomasa, en detrimento de la producción de ácidos grasos volátiles. Se debe resaltar el hecho de la comprobación experimental, de que el efecto no es estequiométrico.
2. El probiótico *Yea Sacc 1026* estimula el crecimiento de *M. elsdenii*, el consumo de sustrato y la formación de producto independientemente de la edad del inóculo y de la concentración inicial de sustrato, en un rango de 8 a 10 g/L. El efecto es perceptible en las cinéticas y se comprueba al comparar tasas específicas, donde el efecto es muy claro, en todos los casos. Los efectos observados sobre la capacidad de consumir ácido láctico y producir ácidos grasos volátiles, son consecuencia de la mayor capacidad de crecimiento, ya que no existe mantenimiento y la formación de producto está ligada al crecimiento. De esta forma, el probiótico promueve un uso más eficiente del sustrato, por *M. elsdenii*, ya que se produce más biomasa, generándose menor cantidad de producto, lo cual se observa, de manera cuantitativa, en los coeficientes de rendimiento.
3. Los coeficientes de afinidad y de muerte, no se modifican con la presencia del probiótico, independientemente de la edad del inóculo y de la concentración inicial de sustrato, en un rango de 8 a 12 g/L. Por otra parte, el efecto de la edad del inóculo sobre los parámetros del modelo, es aumentar la magnitud de los cambios provocados por el probiótico.
4. El efecto principal del probiótico se da sobre la tasa específica máxima de crecimiento, pues ésta se incrementa entre un 30 (con inóculo fresco) y un 112% (con inóculo viejo). El incremento en la tasa específica máxima de crecimiento, se ve reflejado en el incremento del coeficiente de rendimiento

de biomasa con respecto a sustrato, como se discutió en la sección final del capítulo de modelado matemático.

5. El modelo matemático al que se llegó, teniendo la virtud de la sencillez, permitió llevar a cabo un análisis del sistema en su conjunto, que de otra manera hubiese sido muy difícil de realizar. Por ejemplo, sin llevar a cabo el modelado matemático, quizá se abrían despreciado las diferencias encontradas, en los datos de las cinéticas. Así, el modelado matemático, permitió situar las observaciones experimentales en un contexto más amplio, y llevar a cabo un análisis del sistema en su conjunto, que permitió obtener valiosas conclusiones.

Como todo trabajo de investigación, este no agotó el estudio del problema en cuestión, tiene limitaciones y, por lo tanto, se plantean recomendaciones para trabajos futuros sobre el tema. La principal limitación del estudio realizado es, quizá, el haber hecho una sobresimplificación del problema, al trabajar con un solo microorganismo, de la gran variedad que existe en el rumen; sin embargo es un modelo experimental de estudio, que, en términos de consumo de ácido láctico, producción de biomasa y AGV's, representa adecuadamente el comportamiento de la microflora ruminal en condiciones controladas, como se comprobó conjuntamente con otra investigación relacionada (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1997). De manera que las perspectivas planteadas son las siguientes:

1. Se deberían realizar estudios similares, utilizando consorcios microbianos, que se pudieran considerar mejores modelo experimentales al complejo sistema, que el rumen representa, tal vez utilizando líquido ruminal.
2. Si se trabaja nuevamente con *Megasphaera elsdenii*, se debería diseñar un medio de cultivo más simple, y menos rico en nutrientes complejos, que el utilizado en este trabajo, con la finalidad de potenciar aún más el efecto del probiótico.

3. Se debería llevar a cabo un modelado más fino de sistema, realizando un muestreo a intervalos menores, durante la fase de crecimiento y considerar el formular un modelo estructurado.
4. Una opción interesante sería continuar con los estudios en cultivo continuo, desarrollando un nuevo modelo que, además de predecir correctamente los estados estacionarios correspondientes, aportara datos sobre la fisiología de *M. elsdenii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amrane, A. and Prigent, Y. (1994). Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: model development and simulation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* V. 60, p. 241 - 246.
- Annisson, E. F. and Lewis, D. (1981). El metabolismo del rumen. Unión tipográfica Editorial Hispano-Americana, S. A., México.
- Armstead, I. P. and Ling, J. R. (1993). Variations in the uptake and metabolism of peptides and amino acids by mixed ruminal bacteria *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, p. 3360 - 3366.
- Bader, F. B. (1982). Kinetics of double substrate limited growth. pp. 2 - 32 In: Microbial population dynamics. M. J. Bazin (Editor). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- Bellgardt, K. H. (1991). Cell models. In: Rehm, H. J.; Reed, G.; Pühler, A. and Stadler, P (Editors), Schugerl, K. (Volume Editor). Biotechnology Vol. 4. Measuring, Modelling and Control. VCH. Weinheim, Federal Republic of Germany p. 267 - 298.
- Blackman, F. F. (1905). Optimal and limiting factors. *Ann. Bot.* V. 19. p. 281.
- Blanch, H. W. (1981). Invited review: microbial growth kinetics. *Chem. Eng. Commun.* V. 8 pp. 181 - 211.
- Blanch, H. W. and Clark, D. S. (1994). Biochemical engineering, Marcel Dekker. New York, USA
- Boehringer Mannheim (1997). Biochemical catalog. p. 616
- Broock, T. D.; Smith, D. W. and Madigan, M. T. (1987). Microbiología. Prentice-Hall Hispanoamericana, México.

- Buttery, P. J. (1981). Aspects of the biochemistry of rumen fermentation and their implication in ruminant productivity. In: Haresign, W. and Cole, D. J. A. Recent developments in ruminant nutrition. Butterworths, London England.
- Cachon, R.; Molin, P. and Daviès, C. (1995). Modelling of continuous pH-stat stirred tank reactor with *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* immobilized calcium alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* V. 47, p. 567 - 574.
- Caldwel, D. R. and Bryant, M. P. (1966). Medium without rumen fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* V. 14, p. 794 - 801.
- Characklis, W. G. (1983). Process analysis in microbial systems: biofilms as a case study. In: Mathematics in microbiology, Bazin, M. (Editor). Academic Press. London, U.K..
- Counotte, G. H. M.; Prins, R. A.; Janssen, R. H. A. M. and DeBie, M. J. A. (1981). Role of the *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL[2-¹³C] Lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 42 p. 649.
- Crundwell, F. K. (1994). Mathematical modelling of batch and continuous bacterial leaching. *Chem. Eng. J.* V. 54, p. 207 - 220.
- Ellis, J. E.; McIntyre, P. S.; Saleh, M.; Williams, A. G. and Lloyd, D. (1991). Influence of CO₂ and low concentrations of O₂ on fermentative metabolism of the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium*. *J. Gen. Microbiol.* V. 137, p. 1409 - 1417.
- Flora, J. R. V.; Suidan, M. T.; Biswas, P. and Sayles, G. D. (1995). A modeling study of anaerobic biofilm systems II: Reactor modeling. *Biotechnol. Bioeng.* V. 46, p. 54 - 61.
- Fonty, G.; Gouet, P.; Jouang, J. P. and Senaud, J. (1987). Stablistment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* V. 137, p. 1835 - 1843.

- Goodhue, C. T.; Rosazza, J. P. and Peruzzotti, G. P. (1986). Methods for transformation of organic compounds. In: Demain, A. L. and Solomon, N. A. (editors). Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D. C. USA. p. 97 - 121.
- Gutiérrez-Rojas, M. (1995). Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis Doctorado en Ciencias, DCBI - UAMI. México. 195 p.
- Hillman, K.; Lloyd, D. and Williams, A. G. (1988). Interactions between the methanogen *Methanosarcina barkeri* and rumen holotrich ciliate protozoa. *Lett. Appl. Microbiol.* V. 7, p. 49 - 53
- Hino, T. and Kuroda, S. (1993). Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59, pp. 255 - 259.
- Hobson, P. N. (1969). Rumen bacteria. In: Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (Editors). Methods in microbiology, vol. 3B. Academic Press. London, U. K.
- Howell, J. A. (1983). Mathematical models in microbiology: mathematical tool-kit. In: Bazin, M. (Editor). Mathematics in Microbiology. Academic Press. London, U.K.
- Hoyos, G. (1997). Aplicación de la biotecnología en la producción animal: la experiencia mexicana de una década. Memorias del 1er. Simposio Mexicano sobre Probióticos, Junio 18 a 20, Ciudad Universitaria, México D. F., p. 131 - 148.
- Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. Academic Press, New York, USA.
- Jouany, J. P. (1982). Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments.* V. 2 p. 131 - 144.

- Kung, L. and Hession, A. (1995). Preventing *in vitro* lactate acumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* V. 73, p. 250 - 256.
- Lapidus, L. (1962). Digital computation for chemical engineers. McGraw-Hill Book Company, New York, USA. 407 p.
- Latham, M. J.; Sharpe, M. E. and Sutton, J. D. (1971). The microbial flora of the rumen of cows fed low and high cereal rations and its relationships to the rumen fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* V. 34, p. 425 - 434.
- Luedeking, R. and Piret, E. L. (1959). Transient and steady states in continuous fermentation, theory and experiment. *J. Biochem. Microbiol. Tech. eng.* V. 1 p. 431 - 459.
- Luyben, W. L. (1973). Process modelling, simulation and control for chemical engineers, Int. Student Ed. McGraw-Hill. 558p.
- Maher, M.; Roux, G. and Dahhou, B. (1995). A method for estimating the state variables and parameters of fermentation sytems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* V. 63, p. 153 - 159.
- Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Hemann et Cie Paris, France.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* pp. 371 - 394.
- Munack, A. (1985). On parameter identification for complex biotechnical systems. In: Johnson, A (Ed.). Modelling and control of biotechnological processes. Proceedings of the 1 st International Federation of Automatic Control Symposium, 11 - 13 december, Noordwijkerhout, The Netherlands.
- Myers, R.H., Khuri, A. Y. y Carter, W.H., 1989, Response surface methodology: 1966 - 1988. *Technometrics* V. 31, 137 - 157.
- Nagaraja, T. G.; Towne, G. and Beharka., A. A. (1992). Moderation of ruminal fermentation by ciliated in cattle fed a high grain diet. *Appl. Env. Microbiol.* V. 58, p. 2410 - 2414.

- Perlmutter, D. D. (1972). Stability of chemical reactors. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Pirt, S. J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific publications. London, U. K.
- Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky, S. A. and Vetterling, W. T. (1990). Numerical recipes, the art of scientific computing. Cambridge University Press. New York, USA.
- Roels, J. A. (1980). Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* V. 12, p. 2457 - 2514.
- Roels, J. A. (1982). Mathematical models and the design of biochemical reactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* V. 32, p. 59 - 72.
- Russell, J. B. and Baldwin. (1978). Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 36, p. 319 - 329.
- Russell, J. B. and Baldwin. (1979). Comparison of substrate affinities among several rumen bacteria: a possible determinant rumen bacterial competition. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 37, p. 531 - 536.
- Russell, J. B. and Dombrowsky, D. B. (1980). Effect of pH on efficiency of growth by pure culture of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 39, p. 604 - 610.
- Satter, I. D. and Roffler, R. E. (1981). Influence of nitrogen and carbohydrate inputs on rumen fermentation. In: Haresign, W and Cole, D. J. A. Recent developments in ruminant nutrition. Butterworths, London England.
- Saucedo-Castañeda, G.; Carmona de la Torre, J.; Soto-Cruz, O.; Chávez-Rivera, R.; Pérez-Gil, F. y Meneses-Mayo, M. (1997). Potencial de utilización de productos de fermentación sólida como probióticos en rumiantes. Memorias del 1er. Simposio Mexicano sobre Probióticos, Junio 18 a 20, Ciudad Universitaria, México D. F., p. 33 - 60.

- Scheffé, H., 1963, The simplex centroid design for experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society, B. V. 25*, p. 235 - 263.
- Schügerl, K. (1985). Modelling of biotechnological processes. In: Johnson, A (Ed.). *Modelling and control of biotechnological processes. Proceedings of the 1st International Federation of Automatic Control Symposium, 11 - 13 december, Noordwijkerhout, The Netherlands.*
- Slyter, L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *J. Animal Sci. V. 43*, p. 910 -929.
- Smith, J. (1991). Probiotics-fact or fiction? *J. Chem. Tech. Biotechnol. V. 51*, p. 539 - 570.
- Starzak, M.; Krzystek, L.; Nowicki, L. and Michalski, H. (1994). Macroapproach kinetics of ethanol fermentation by *Sacharomyces cervisiae*: experimental studies and mathematical modelling. *Chem. Eng. J. V. 54*. p. 221 - 240.
- Stewart, C. S. and Bryant, M. P. (1988). The rumen bacteria. In: Hobson, P. N. (Editor). *The rumen microbial ecosystem. Elsevier Applied Science. London, U.K.*
- Taniguch, K.; Huntinton, G. B. and Glenn, B. P. (1995). Net nutrient flux by visceral tissues of beef steers given abomasal and ruminal infusions of casein and starch. *J Anim. Sci. V. 73*, p. 236 - 249.
- Tapia M. N.; Herrera, S. R.; Gutiérrez, R. M.; Roussos, S. and Viniegra, G. G. (1988). The effect of four fungal compounds on probiotics *in vitro* dry matter disappearance of different feedstuffs. *J. Anim. Sci. V. 66 (Suppl 1)* , p. 1260.
- Thomas, P. C. and Rook J. A. F. (1981). Manipulation of rumen fermentation. In: Haresign, W and Cole, D. J. A. *Recent developments in ruminant nutrition. Butterworths, London England.*
- Trambouze, P. (1979). Reactor scale-up philosophy. *Chem. Eng. V. 10*, p. 122 - 130.

- Tsao, G. T. and Hanson, T. P. (1975). Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. *Biotechnol. Bioeng.* V. 17, p. 1591.
- Wang, D. I. C.; Cooney, C. L.; Demain, A. L.; Dunnill, P.; Humphrey, A. E. and Lilly, M. D. (1979). *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 78.
- Williams, P. E. V. (1991). The effects of fungal cultures on rumen fermentation and ruminal productivity. In: Smith, J. Probiotics-fact or fiction. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* V. 51 p. 539 - 570.
- Wilson, P. N. y Brigstocke, T. D. A. (1987). *Avances en la alimentación de vacuno y ovino*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

APENDICES

Apéndice 1. Nomenclatura

B	Concentración de probiótico	g/L
D	Tasa de dilución	h^{-1}
J	Índice de desempeño	adimensional
K	Constante de afinidad en el modelo de Blackman	g/L
k	Factor máximo de mejoramiento de μ	adimensional
K_B	Constante de afinidad del probiótico	g/L
K_d	Constante de muerte	h^{-1}
K_S	Constante de afinidad en el modelo de Monod	g/L
P	Concentración de producto	g/L
P_0	Concentración de producto al tiempo cero	g/L
P_f	Concentración final de producto	g/L
P_i	Concentración inicial de producto	g/L
P_{max}	Concentración máxima de producto (observada)	g/L
Q	Flujo volumétrico	L/h
q_s	Tasa específica de consumo de sustrato	$\frac{\text{g sustrato}}{\text{g biomasa} \cdot \text{h}}$
q_p	Tasa específica de formación de producto	$\frac{\text{g producto}}{\text{g biomasa} \cdot \text{h}}$
R_p	Tasa de formación de producto	g producto/L*h

R_S	Tasa de consumo de sustrato	g sustrato/L*h
R_X	Tasa de crecimiento celular	g biomasa/L*h
S	Concentración de sustrato	g/L
S_0	Concentración de sustrato al tiempo cero	g/L
S_a	Concentración de sustrato en la alimentación	g/L
S_f	Concentración final de sustrato	g/L
S_i	Concentración inicial de sustrato	g/L
S_{max}	Concentración máxima de sustrato (observada)	g/L
t	Tiempo	h
V	Volumen de reacción	L
X	Concentración de biomasa	g/L
X_0	Concentración de biomasa al tiempo cero	g/L
X_f	Concentración final de biomasa	g/L
X_i	Concentración inicial de biomasa	g/L
X_{max}	Concentración máxima de biomasa (observada)	g/L
$Y_{p/x}$	Coficiente de rendimiento de producto con respecto a biomasa	$\frac{\text{g producto}}{\text{g biomasa}}$
$Y_{x/s}$	Coficiente de rendimiento de biomasa con respecto a sustrato	$\frac{\text{g biomasa}}{\text{g sustrato}}$

Símbolos griegos

α	Coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento	$\frac{\text{g producto}}{\text{g biomasa}}$
β	Coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento	$\frac{\text{g producto}}{\text{g biomasa} \cdot \text{h}}$
μ	Tasa específica de crecimiento	h^{-1}
$\mu_{m,app}$	Tasa específica máxima de crecimiento, aparente	h^{-1}
μ_{max}	Tasa específica máxima de crecimiento	h^{-1}
χ^2	chi cuadrada	adimensional

Apéndice 2. Gráficas de tiempo contra logaritmo natural de la concentración de biomasa, para la fase de muerte del cultivo

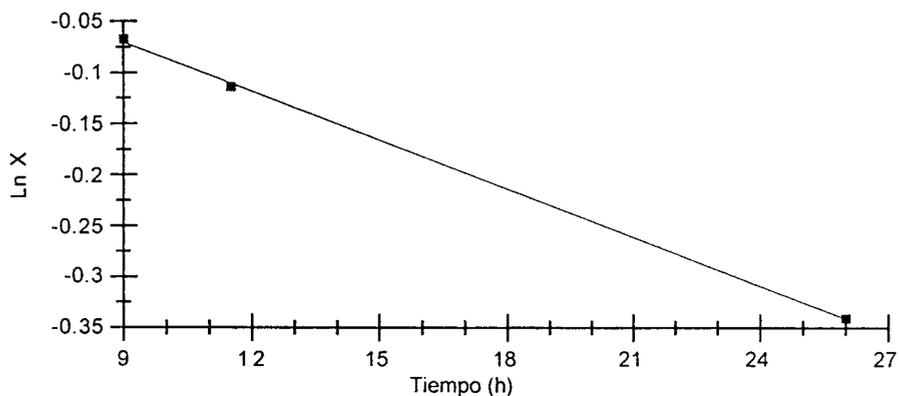


Fig. A2-1. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética con extracto de levadura en cultivo por lote, con 12 g/L de sustrato inicial. La recta de regresión es $LnX = -0.0159t$ con coeficiente de correlación $R^2 = 0.999$.

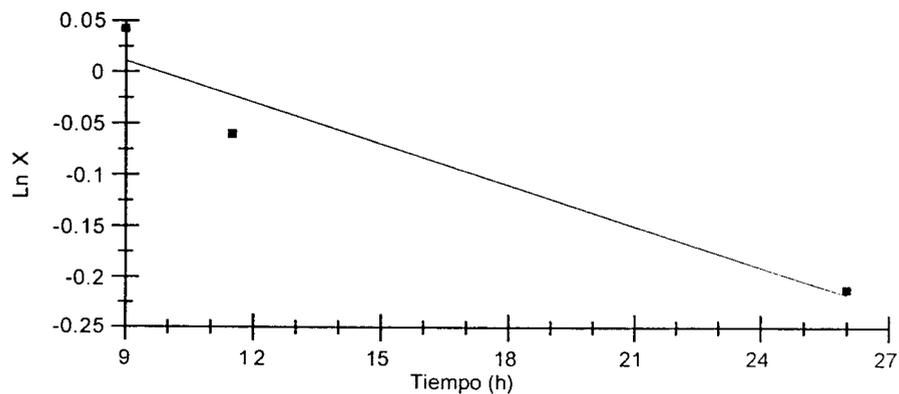


Fig. A2-2. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética con probiótico en cultivo por lote, con 12 g/L de sustrato inicial. La recta de regresión es $LnX = -0.0134t$ con coeficiente de correlación $R^2 = 0.926$.

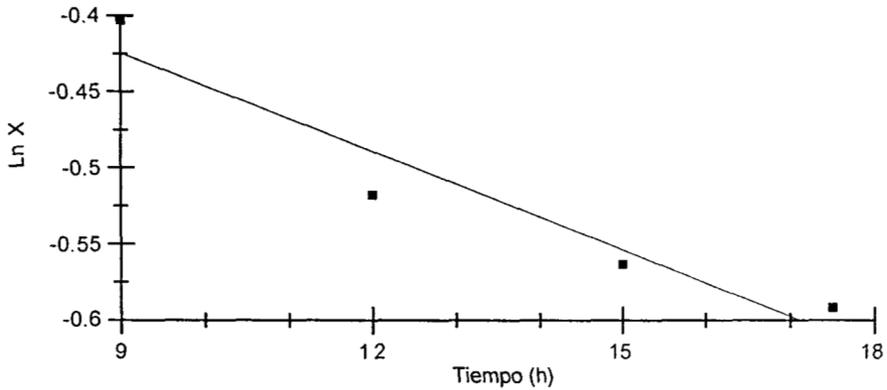


Fig. A2-3. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética sin probiótico en cultivo por lote, con 8 g/L de sustrato inicial. La recta de regresión es $\ln X = -0.0127t$ con coeficiente de correlación $R^2 = 0.921$.

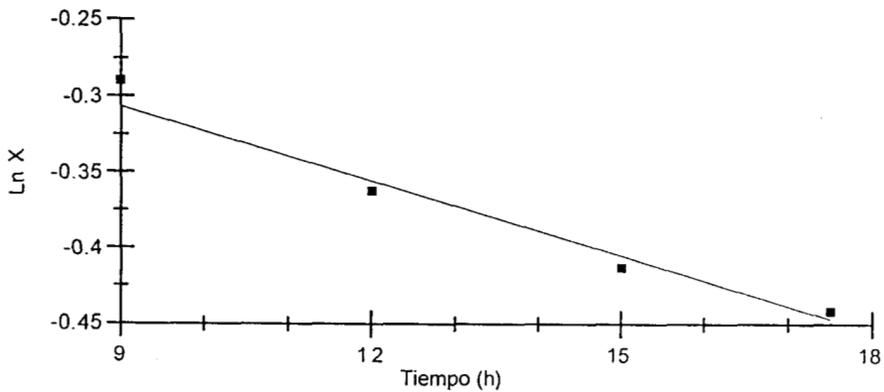


Fig. A2-4. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética con probiótico en cultivo por lote, con 8 g/L de sustrato inicial. La recta de regresión es $\ln X = -0.0145t$ con coeficiente de correlación $R^2 = 0.979$.

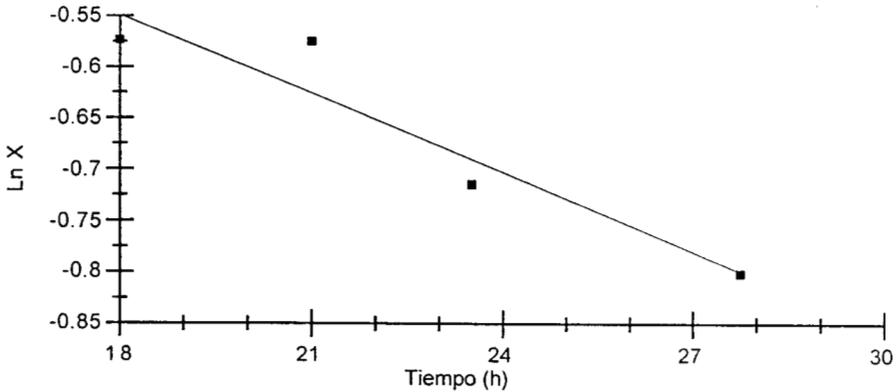


Fig. A2-5. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética sin probiótico en cultivo por lote, utilizando inóculo viejo y 10 g/L de sustrato inicial. La recta de regresión es $LnX = -0.0125t$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.899$.

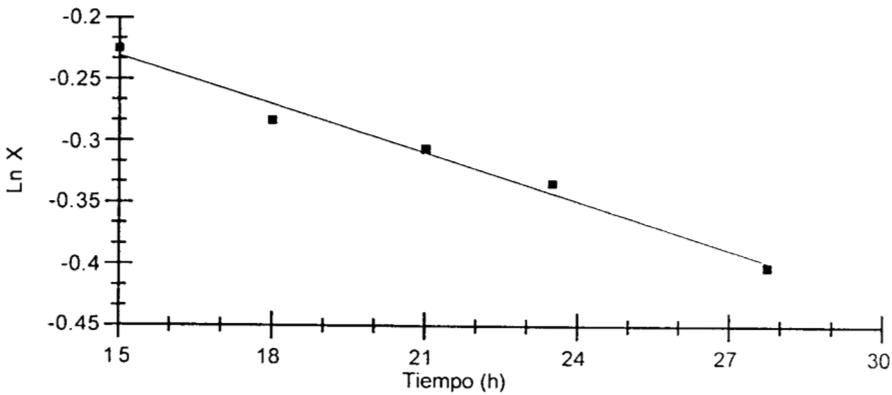


Fig. A2-6. Linearización de la fase de muerte de *M. elsdenii* para la cinética con probiótico en cultivo por lote, utilizando inóculo viejo y 10 g/L de sustrato inicial. La recta de regresión es $LnX = -0.0131t$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.982$.

Apéndice 3. Gráficas de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato

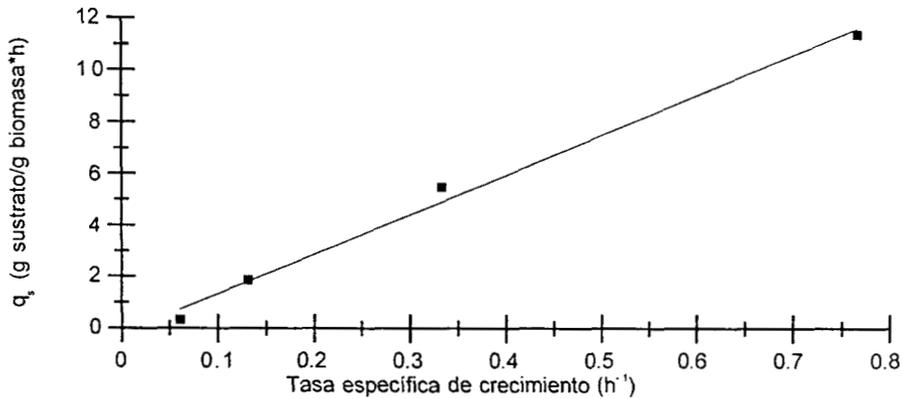


Fig. A3-1. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 12 g/L, con extracto de levadura. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 15.31\mu - 0.21$ con $R^2 = 0.992$

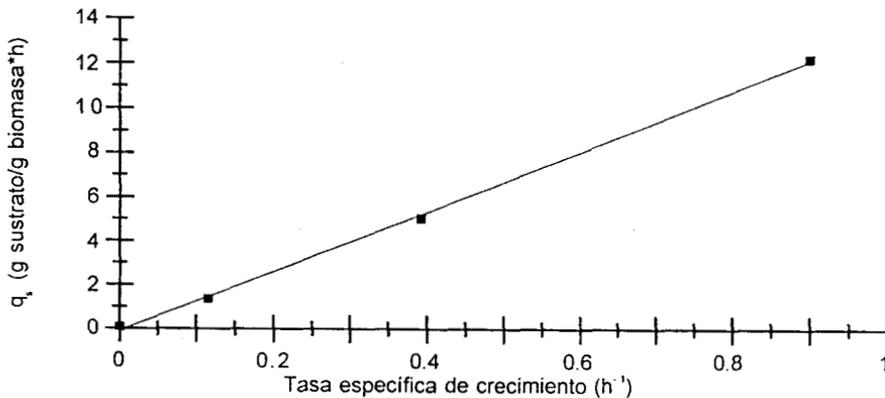


Fig. A3-2. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 12 g/L, con probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 13.56\mu - 0.115$ con $R^2 = 0.999$

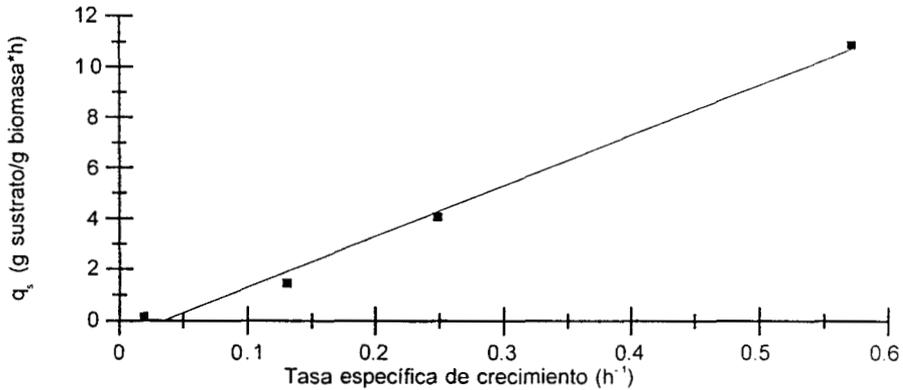


Fig. A3-3. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 8 g/L, sin probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 19.86\mu - 0.695$ con $R^2 = 0.993$

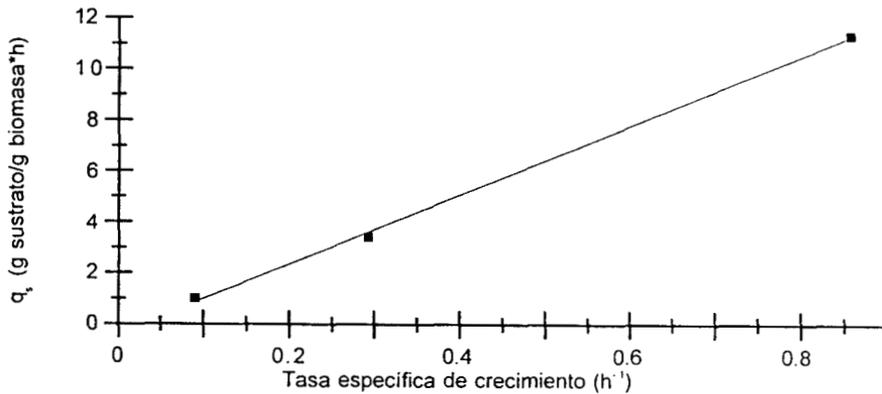


Fig. A3-4. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 8 g/L, con probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 13.48\mu - 0.349$ con $R^2 = 0.999$

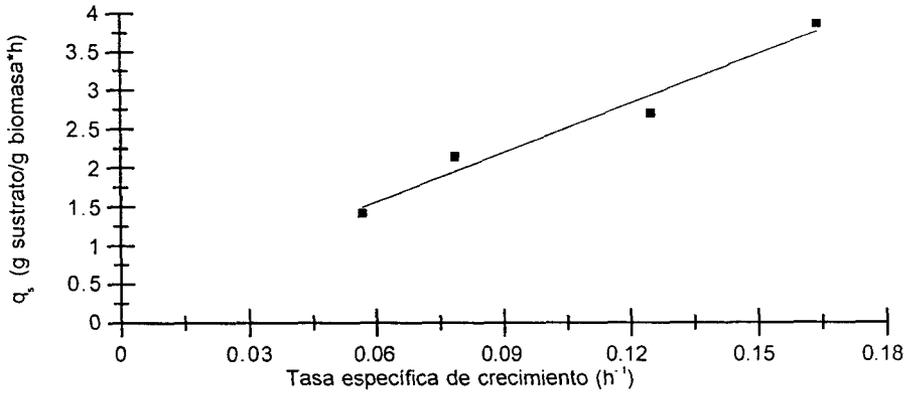


Fig. A3-5. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 10 g/L, sin probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 20.94\mu - 0.302$ con $R^2 = 0.967$

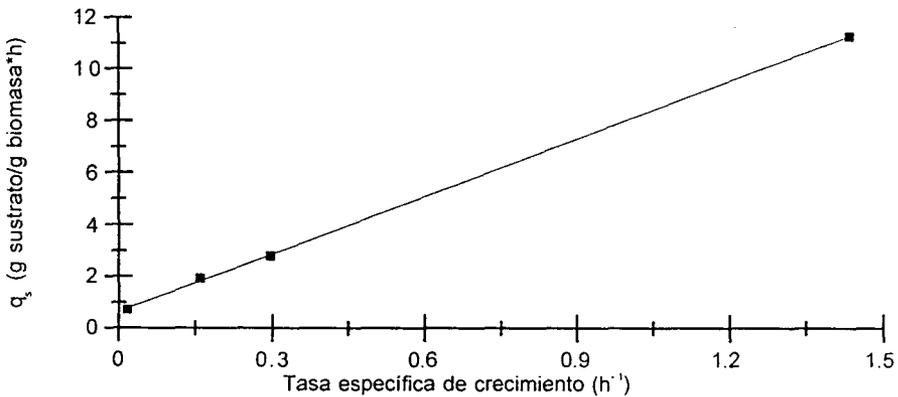


Fig. A3-6. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de consumo de sustrato para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 10 g/L, con probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_s = 7.38\mu - 0.645$ con $R^2 = 0.999$

Apéndice 4. Gráficas de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto

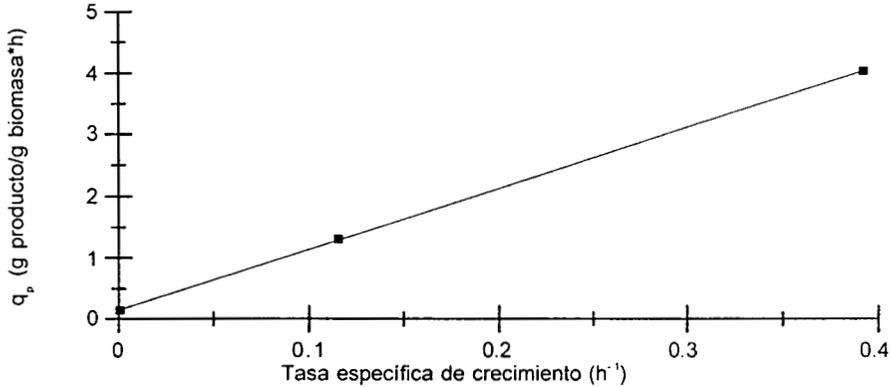


Fig. A4-1. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 12 g/L, con probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_p = 9.89\mu + 0.14$ con $R^2 = 0.999$

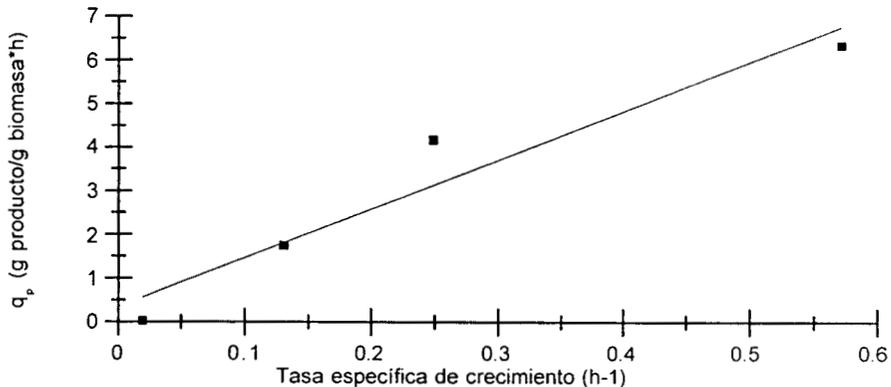


Fig. A4-2. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 8 g/L, sin probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_p = 11.15\mu + 0.35$ con $R^2 = 0.933$

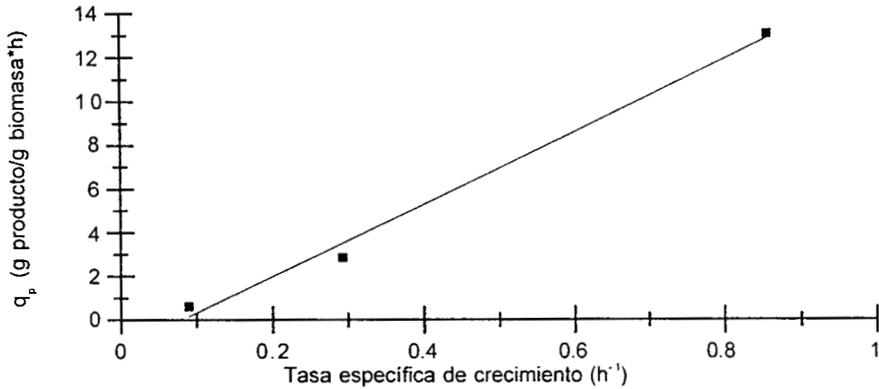


Fig. A4-3. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 8 g/L, con probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_p = 16.52\mu - 1.33$ con $R^2 = 0.992$

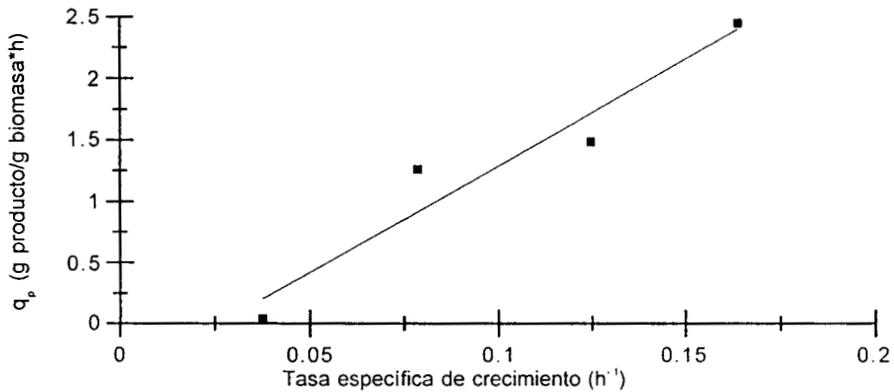


Fig. A4-4. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 10 g/L, sin probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_p = 17.33\mu - 0.45$ con $R^2 = 0.929$

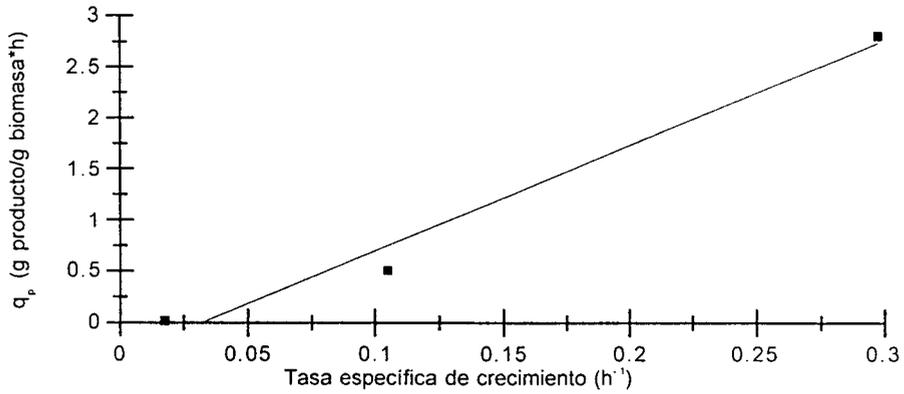


Fig. A4-5. Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto para la cinética en que se utilizó una concentración inicial de sustrato de 10 g/L, con probiótico. Se presenta la recta de regresión cuya ecuación es $q_p = 10.26\mu - 0.33$ con $R^2 = 0.979$

Apéndice 5. Gráficas de curvas de nivel para los ajustes de parámetros

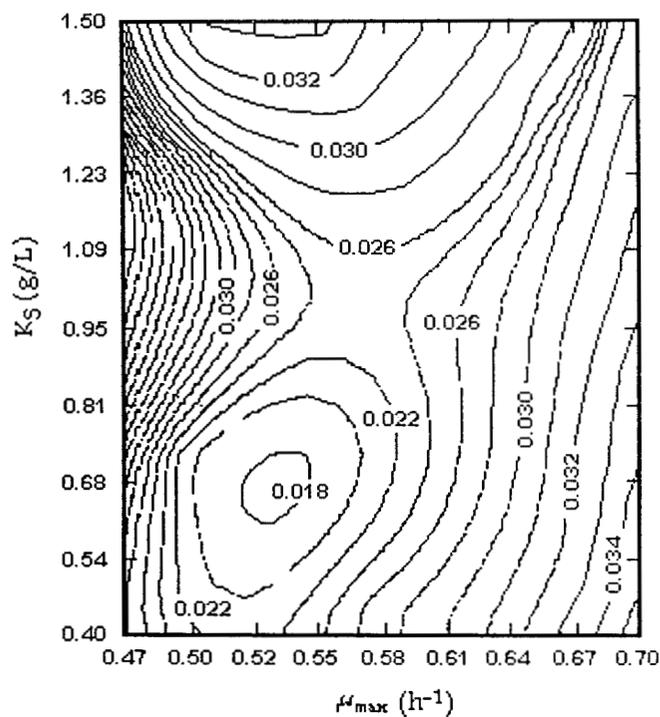


Fig. A5-1. Curvas de nivel para el ajuste de parámetros, correspondiente a la cinética con probiótico y concentración inicial de sustrato de 12 g/L. El mínimo corresponde a los valores de $\mu_{\max} = 0.525 \text{ h}^{-1}$ y $K_S = 0.68 \text{ g/L}$, con valor de $J = 0.017$.

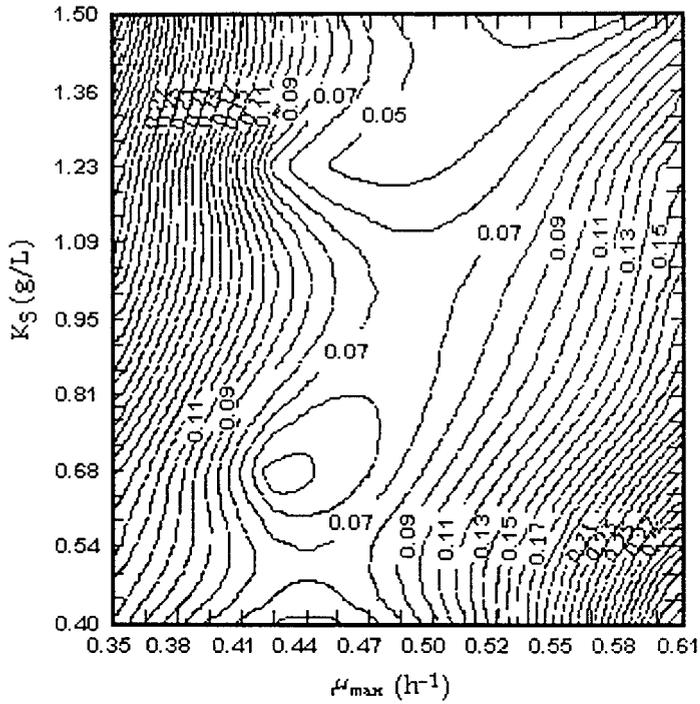


Fig. A5-2. Curvas de nivel para el ajuste de parámetros, correspondiente a la cinética sin probiótico y concentración inicial de sustrato de 8 g/L. El mínimo corresponde a los valores de $\mu_{\max} = 0.4375 \text{ h}^{-1}$ y $K_S = 0.68 \text{ g/L}$, con valor de $J = 0.042$.

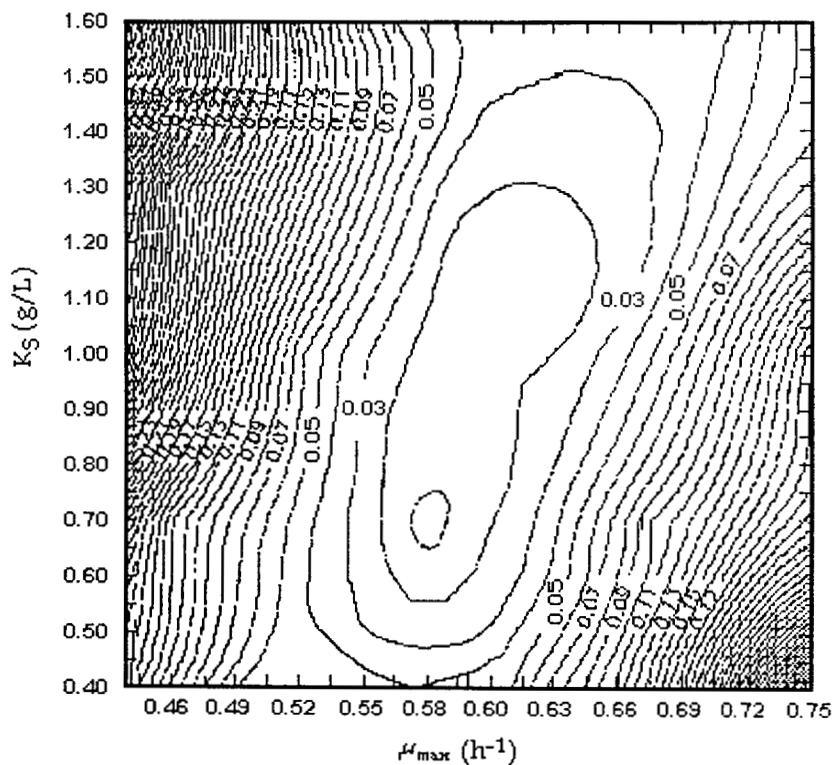


Fig. A5-3. Curvas de nivel para el ajuste de parámetros, correspondiente a la cinética con probiótico y concentración inicial de sustrato de 8 g/L. El mínimo corresponde a los valores de $\mu_{\max} = 0.58 \text{ h}^{-1}$ y $K_S = 0.70 \text{ g/L}$, con valor de $J = 0.0053$.

Apéndice 6. Comparaciones de los datos experimentales contra las simulaciones numéricas

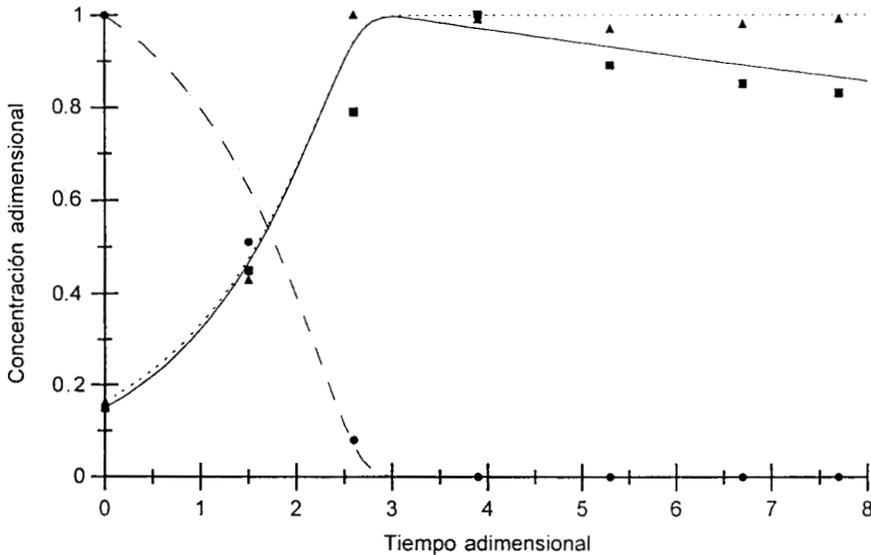


Fig. A6-1. Comparación de las cinéticas experimentales de concentración adimensional de biomasa (■), sustrato (●) y producto (▲), contra las simulaciones numéricas correspondientes; biomasa (línea continua), sustrato (línea a trazos largos) y producto (línea a trazos cortos), para el experimento sin probiótico y con concentración inicial de sustrato de 8 g/L. Los valores de las funciones objetivo, para este ajuste son: $J = 0.042$ y $\chi^2 = 0.104$

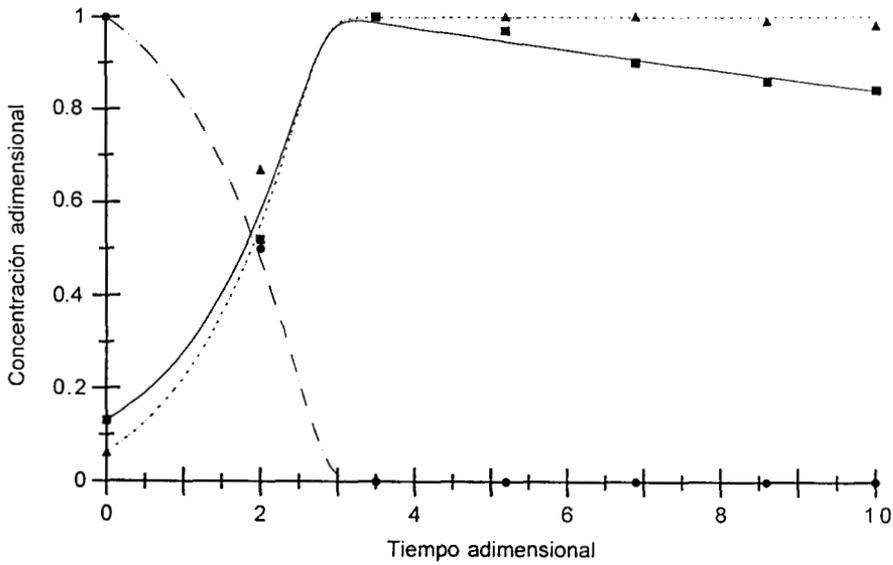


Fig. A6-2. Comparación de las cinéticas experimentales de concentración adimensional de biomasa (■), sustrato (●) y producto (▲), contra las simulaciones numéricas correspondientes; biomasa (línea continua), sustrato (línea a trazos largos) y producto (línea a trazos cortos), para el experimento con probiótico y con concentración inicial de sustrato de 8 g/L. Los valores de las funciones objetivo, para este ajuste son: $J = 0.0053$ y $\chi^2 = 0.33$

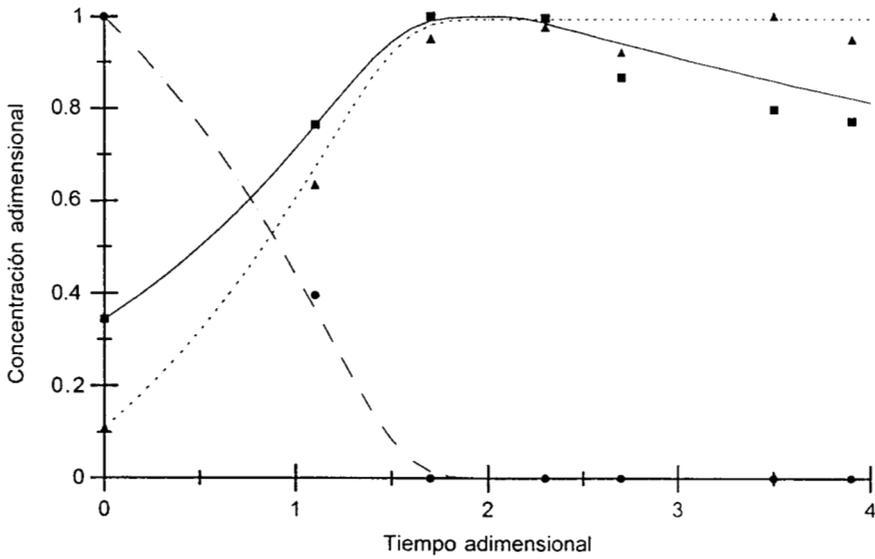


Fig. A6-3. Comparación de las cinéticas experimentales de concentración adimensional de biomasa (■), sustrato (●) y producto (▲), contra las simulaciones numéricas correspondientes; biomasa (línea continua), sustrato (línea a trazos largos) y producto (línea a trazos cortos), para el experimento sin probiótico y con concentración inicial de sustrato de 10 g/L, utilizando inóculo viejo. Los valores de las funciones objetivo, para este ajuste son: $J = 0.024$ y $\chi^2 = 0.913$

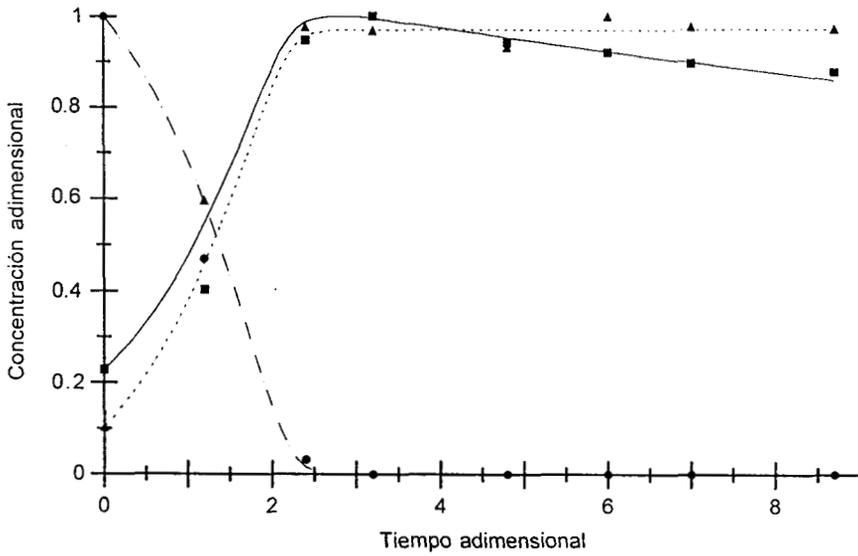


Fig. A6-4. Comparación de las cinéticas experimentales de concentración adimensional de biomasa (■), sustrato (●) y producto (▲), contra las simulaciones numéricas correspondientes; biomasa (línea continua), sustrato (línea a trazos largos) y producto (línea a trazos cortos), para el experimento con probiótico y con concentración inicial de sustrato de 10 g/L, utilizando inóculo viejo. Los valores de las funciones objetivo, para este ajuste son: $J = 0.0086$ y $\chi^2 = 0.18$