



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**ACONDICIONAMIENTO DE UN REACTOR DE TANQUE AGITADO
PARA FERMENTACIONES AEROBIAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

DULCE PAOLA GONZÁLEZ BECERRIL

ASESOR

DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

MORELIA, MICHOACÁN.

NOVIEMBRE 2007

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	I
GLOSARIO	V
RELACIÓN DE FIGURAS	VI
RELACIÓN DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
DEDICATORIAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XIII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	4
2.1 LA BIOTECNOLOGÍA	4
2.2 EL BIORREACTOR	5
2.2.1 Agitación y mezclado de fluidos y necesidades de potencia	8
2.2.2 Tipos de agitación	8
2.2.3 Tipos de flujo en tanques agitados	9
2.2.4 Agitadores	10
2.2.4.1 Agitadores de hélice	10
2.2.4.2 Agitadores de paletas	11
2.2.4.3 Agitadores de turbina	12
2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS	12
2.4 <i>Gibberella fujikuroi</i> Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS	13
2.4.1 Química y clasificación de las giberelinas	15
2.4.2 Efectos biológicos de las giberelinas	15
2.4.3 Obtención de giberelinas	15
2.4.3.1 Microorganismos productores de giberelinas	16
2.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN	17
2.5.1 Factores nutricionales	17
2.5.1.1 Carbono	17
2.5.1.2 Nitrógeno	17

	Página
2.5.1.3 Las sales minerales y trazas de elementos	18
2.5.2 Condiciones fisicoquímicas de cultivo necesarias	18
2.5.2.1 Temperatura	18
2.5.2.2 pH	19
2.5.2.3 Aireación y agitación	19
2.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	21
2.6.1 Fases de crecimiento	22
2.6.1.1 Fase de latencia	22
2.6.1.2 Fase exponencial	23
2.6.1.3 Fase estacionaria	23
2.6.1.4 Fase terminal	23
2.6.2 Modelos de cinética de crecimiento microbiano	24
2.7 JUSTIFICACIÓN	25
2.8 OBJETIVO GENERAL	26
2.8.1 Objetivos particulares	26
2.9 HIPÓTESIS	26
CAPÍTULO III. DESARROLLO DEL TRABAJO	27
3.1 ACONDICIONAMIENTO Y MONTAJE DEL REACTOR	27
3.1.1 Alimentación de aire para el medio de cultivo	28
3.1.2 Agitación	28
3.1.3 pH	29
3.1.4 Temperatura	29
3.1.4.1 Calentamiento del medio de cultivo	29
3.1.4.2 Medición de la temperatura	29
3.1.5 Alimentación del reactor y toma de muestras	30
3.2 FERMENTACIONES AEROBIAS	30
3.2.1 Preparación del inóculo	30
3.2.1.1 Preparación del medio de cultivo para el inóculo	31
3.2.1.2 Preparación de la solución isotónica	31

	Página
3.2.1.3 Esterilización	32
3.2.1.4 Resuspensión del hongo	33
3.2.1.5 Inoculación	33
3.2.2 Preparación del medio de cultivo para las fermentaciones	35
3.2.2.1 Compuestos	35
3.2.2.1.1 Composición de los medios de cultivo empleados	35
3.2.3 Preparación del material a esterilizar	36
3.2.4 Preparación del reactor para la fermentación	36
3.2.4.1 Limpieza	36
3.2.4.2 Armado	37
3.2.4.3 Accesorios	37
3.2.4.4 Carga del reactor	38
3.2.5 Operación del reactor	38
3.2.6 Toma de muestras	39
3.2.7 Descarga del reactor	39
3.2.8 Análisis de las muestras	40
3.2.8.1 Biomasa	40
3.2.8.2 Identificación de la presencia de metabolitos secundarios	40
3.2.8.2.1 Extracción líquido-líquido	40
3.2.8.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)	41
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS	42
4.1 RESULTADO DEL ACONDICIONAMIENTO DEL REACTOR	42
4.1.1 Alimentación de aire	42
4.1.2 Compresor de aire	42
4.1.3 Rotámetro	43
4.1.4 Filtros de aire	44
4.1.5 Accesorios para medir pH	44
4.1.6 Accesorios de temperatura	45
4.1.7 Equipo para toma de muestra	47

	Página
4.2 ESTIMACIÓN DEL EQUIPO REQUERIDO PARA EL ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA DE FERMENTACIÓN AEROBIA	49
4.3 RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES AEROBIAS	50
4.3.1 Fermentación 1	51
4.3.2 Fermentación 2	53
4.3.3 Fermentación 3	55
4.4 DETECCIÓN DE GIBERELINAS	57
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	60
6.1 Recomendaciones	60
6.2 Sugerencias	60
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA	61
CAPÍTULO VIII. APÉNDICE	63

GLOSARIO

- **BIOLOGÍA MOLECULAR.** Conjunto de técnicas que permiten el estudio de moléculas de nucleótidos, así como la modificación de la expresión de proteínas y metabolitos.
- **BIOMASA.** Cantidad de materia viva. Es la cantidad de materia en los organismos por unidad de superficie o volumen expresado en unidad de peso. Masa de material viviente.
- **BIOTECNOLOGÍA.** Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.
- **CEPA.** Organismo que presenta un fenotipo característico reproducible de una generación a otra.
- **ENZIMA.** Macromolécula que actúa como catalizador biológico, la mayoría de las enzimas son proteínas pero algunos RNA llamados ribozimas también presentan actividad catalítica.
- **INOCULAR.** Verter bacterias u hongos directamente en un medio con nutrientes para cultivarlas y estudiarlas.
- **MICROORGANISMOS.** Organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos.
- **NUTRIENTE.** Aquello que es causa del aumento, actividad o vigor de algún organismo o grupo de ellos. Incluye generalmente fosfatos, nitratos, silicatos, cobre, manganeso, cobalto, hierro.
- **REPRESIÓN CATABÓLICA.** Desconexión rápida de la ruta biosintética de un determinado compuesto, cuando éste aparece aportado en el medio de las bacterias. Se pueden desconectar genes para evitar que su expresión interfiera con otros procesos que ya están en curso de la célula. La represión permite el ajuste de una sustancia que interviene como intermediario metabólico.
- **SOLUCIÓN ISOTÓNICA.** Sustancia con una concentración de sólidos igual a la concentración interna de sólidos de la célula donde se aplique.

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura	Página
2.1 Resistencias a la transferencia de masa	7
2.2 Patrones de flujo	11
2.3 Propelas Rushton	12
2.4 Estructuras de giberelinas	14
2.5 Fases del crecimiento microbiano	22
3.1 Reactor de tanque agitado marca Ace Glass	27
3.2 Autoclave marca Felisa	33
3.3 Compresor de aire. Alimenta el medio para el crecimiento del inóculo	34
3.4 Baño maría marca Felisa	34
4.1 Difusor de aire	42
4.2 Compresor	43
4.3 Instalación de la línea de aire para el funcionamiento del motor	43
4.4 Sistema de alimentación de aire al medio	43
4.5 Filtro cápsula	44
4.6 Filtro pirinola	44
4.7 Potenciómetro marca Corning	45
4.8 Sensor de pH	45
4.9 Baño termocirculador	45
4.10 Instalación del baño termocirculador	46
4.11 Termómetro marca Ace Glass	46
4.12 Termopar tipo J	46
4.13 Termopozo	46
4.14 Sistema de alimentación al reactor	47
4.15 Tubo toma muestra	47
4.16 Bomba peristáltica	47
4.17 Reactor de tanque agitado acondicionado para fermentaciones aerobias	48
4.18 Cinética de crecimiento. Fermentación 1	51
4.19 Comportamiento del pH. Fermentación 1	52
4.20 Cinética de crecimiento. Fermentación 2	53

	Página
4.21 Comportamiento del pH. Fermentación 2	54
4.22 Vista del frotis al microscopio. Fermentación 2	55
4.23 Cinética de crecimiento. Fermentación 3	55
4.24 Comportamiento del pH. Fermentación 3	56
4.25 Frotis de la muestra de la tercera fermentación	57
4.26 Identificación de giberelinas. Cromatografía en capa fina	58
A1 Reactor de tanque agitado marca Ace Glass	63
A2 Placa base del motor de aire	64
A3 Tapa del reactor	64
A4 Tapa del reactor unida al motor y a la propela	64
A5 Tanque del reactor	65
A6 Abrazadera de seguridad	65
A7 Postes de la abrazadera de seguridad	65
A8 Tanque del reactor	66
A9 Boquillas de la chaqueta	66
A10 Propela	66
A11 Principales partes de la propela	67
A12 Propela fuera del eje	67
A13 Unión de la tapa y el eje	67
A14 Accesorios de la propela	68

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla	Página
2.1 Giberelinas producidas por microorganismos	16
3.1 Composición del medio de cultivo para el inóculo	31
3.2 Concentraciones de los experimentos	35
4.1 Equipo adquirido	49
4.2 Cotización de equipo probado	50

“ACONDICIONAMIENTO DE UN REACTOR DE TANQUE AGITADO PARA EL DESARROLLO DE FERMENTACIONES AEROBIAS”

Presenta: Dulce Paola González B.

Dirigió.: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga.

RESUMEN

La principal finalidad del presente trabajo fue realizar el acondicionamiento de un reactor de tanque agitado de 7 litros marca Ace Glass, que se encuentra en el Laboratorio de Electroquímica e Investigación en el edificio E de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para realizar fermentaciones aerobias. Para tal efecto se trabajó en la implementación de diversos equipos que ayudan a mantener las condiciones ambientales para el adecuado desarrollo de los microorganismos. Las principales condiciones a controlar o medir fueron la temperatura, pH, aireación y agitación. Para poder adquirir estos accesorios o equipos se consultaron varios proveedores y se seleccionaron los más apropiados para el reactor.

Cabe mencionar que en la Facultad de Ingeniería Química se está atendiendo la necesidad del estudio de nuevas corrientes de la ciencia como lo es la biotecnología, para complementar el proceso enseñanza-aprendizaje es imperativo incluir prácticas y el uso de una adaptación como esta resulta más viable económicamente que la compra de un biorreactor con un fabricante.

Una vez acondicionado el biorreactor se procedió a realizar pruebas de fermentaciones para la obtención de metabolitos secundarios con la finalidad de comprobar la funcionalidad del reactor; caso de estudio: obtención de giberelinas empleando el hongo *Gibberella fujikuroi*.

Al final del trabajo se reporta que el acondicionamiento realizado al reactor fue exitoso ya que los datos experimentales obtenidos de las fermentaciones realizadas indican que existió crecimiento de biomasa, lo que significa que las fermentaciones se pueden desarrollar de manera adecuada, teniendo el sistema en condiciones de operación para realizar fermentaciones aerobias.

“CONDITIONING OF A STIRRED TANK REACTOR FOR AEROBIC FERMENTATIONS”

SUMMARY

Dulce Paola González Becerril

The main objective of the present work was to make the conditioning of a Stirred Tank Reactor of 7 liters Ace Glass trademark, property of the “San Nicolas de Hidalgo University”, for aerobic fermentations. To do so, it is install several equipments in order to maintain environmental conditions for the optimal development of the microorganisms. The main parameters to control and measurement were temperature, pH, stirring and aeration. To acquire all the instrumentation and equipment it is consulted several suppliers and it is selected the most proper equipment for the reactor, being this stage the first in this research.

It is worth to mention this University is taking care and watching the needs of studying the new directions on science, being one of this “Biotechnology”. To complete the process of teaching-learning it is really necessary to include practical work and sometimes to adapt technology (such as this one) being this practice cheaper than buying a new one.

Once upgraded the reactor, it is make some experimental fermentations to obtain secondary metabolites and mainly to prove this reactor really works. In this case, it is obtain gibberellins using *Gibberella fujikuroi* fungus.

Finally it is conclude that conditioning of this reactor was successful because of the experimental data obtain from the fermentation shows an increment of the biomass, what means, again, the success of the fermentations.

Adviser: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme llegar a este momento tan grande en mi vida y sobre todo porque a mi lado están apoyándose las personas que me quieren y son importantes en mi vida. Gracias Señor.

A MIS PADRES. LUIS Y LUPE

Porque gracias a ustedes soy mi presente. Gracias por inculcarme el amor a luchar por lo que quiero. Porque sin su apoyo, yo no sería lo que soy ahora. Gracias.

A MIS HERMANOS. ALDO E IVAN

Porque aunque somos muy diferentes siempre me han impulsado a no dejar de luchar y siempre han estado junto a mí. Gracias.

A MI ESPOSO Y MI HIJA ENRIQUE Y FERNANDA

Porque son mi mayor reto y mi motivo para siempre querer salir adelante siendo una mejor persona. Los amo.

A MIS ABUELITOS. JUAN† Y TIT†

Porque fueron una base muy importante en mi y no han dejado de acompañarme un solo día.

A MIS TIAS

Porque sin su apoyo simplemente no podría haber llegado a este punto tan importante para mí.

A MI ABUELITA MARIELENA Y MI ABUELO JUAN

Porque siempre han estado presentes y al pendiente de mis problemas y mis triunfos.

A MI TIO ALEJANDRO

Porque a pesar de estar lejos, siempre creíste en mí, muchas veces más que yo misma.

A MIS TIOS

Gracias por siempre tener una palabra de aliento para mí. Y creer que podía salir adelante.

A MIS SUEGROS Y MI CUÑADO

Gracias porque su apoyo fue fundamental para que pudiera yo llegar a este punto.

A LAS AMISTADES

En mi estancia en la Facultad pude hacerme de grandes amistades, especialmente Isis, gracias porque pude encontrar una amistad sincera.

A LAS BRUJAS

Martha, Karla y Denise porque son las hermanas que tuve la oportunidad de escoger y siempre me han apoyado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, por todo el tiempo y dedicación que le otorgó al proyecto.
- A los integrantes de la mesa de sinodales, M. D. H. Teresa Lourdes López González y Dr. Jaime Espino Valencia por el tiempo que la dedicaron a la revisión del trabajo y por sus atenciones.
- A la Dra. Mariana Ramos Estrada, al Dr. Medardo Serna González y al Dr. Agustín Jaime Castro Montoya por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.
- Al Instituto Tecnológico de Morelia por el apoyo brindado que fue fundamental para la realización del presente trabajo de tesis.
- Al Instituto Tecnológico de Celaya por facilitarnos la cepa empleada y las atenciones otorgadas.
- A la Facultad de Ingeniería Química de la UMSNH por las facilidades para realizar este trabajo en uno de sus laboratorios.
- A la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera de la UMSNH por las atenciones prestadas para la realización del trabajo.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En biotecnología, se llama “fermentación” a un proceso donde grandes cantidades de microorganismos producen algún tipo de sustancia. La especie y cepa elegida será aquella que se adapte mejor a las condiciones de cultivo a gran escala y, a la vez, produzca la mayor cantidad de sustancia requerida, además que se pueda recolectar con facilidad. En realidad, la mayor parte de los microorganismos que son capaces de fabricar un determinado producto no lo hacen en cantidades significativas para la escala industrial, así que hay que emprender una labor de “mejora”, a la cuál se encuentran asociadas dos líneas:

- a) La ingeniería genética (a partir de la década de los 70) busca introducir las características deseadas en el ADN del organismo.
- b) Las técnicas tradicionales, mediante tanteo y error en la selección, consisten en elegir, de entre el ingente número de cepas naturales que hay de un microorganismo dado, aquellas que sean más rentables para el propósito específico (una de las mejores muestras industriales es *Penicillium*, el microorganismo que produce penicilina, provino de un melón de New Jersey).

También hay un camino intermedio, que consiste en aumentar el número de variantes o cepas, mediante la inducción de mutaciones (rayos UV, rayos X); evidentemente, el proceso es aleatorio pero aumenta la probabilidad de lograr un resultado favorable (Prentis, 2000).

El paso del laboratorio a la producción industrial, una vez obtenida la cepa deseada, es delicado. Debido a que surgen nuevos problemas, como el aporte de los mejores nutrientes, la prevención de la contaminación y el control de las condiciones óptimas de fermentación (especialmente aerobiosis o anaerobiosis, temperatura, contaminación biológica y enfermedades, pH, etc.). Y las soluciones

no pueden ser sólo ajustar todo ello a las mejores condiciones de crecimiento del organismo, sino que se han de tener en cuenta factores de rentabilidad económica, con un análisis de costo-beneficio. Por ejemplo, para evitar el envejecimiento del cultivo, se procede a vaciar el tanque por completo y desechar los microorganismos cada cierto tiempo, sustituyéndolos por otros nuevos. Evidentemente, acompañado de la esterilización de los recipientes industriales.

Completado el proceso de fermentación, el tanque está lleno de un espeso caldo de células, nutrientes no consumidos, productos y desechos. Hay que proceder, por tanto a la purificación. De poco habrán valido los esfuerzos anteriores, y obtener una cepa de muy alto rendimiento, si alguna sustancia interfiere con el producto y lo degrada antes de recolectarlo, o si hace muy cara su purificación. En muchos casos hay que romper las células para liberar el producto, lo que complica enormemente la tarea. Sin embargo, al nivel de investigación es posible obtener la sustancia deseada unida a un fragmento proteínico, que puede servir para que la bacteria o el moho la excreten; falta trasladarlo al ámbito industrial. Este es un campo en plena efervescencia, donde es frecuente que a diario lleguen nuevos métodos a los despachos científicos y a las industrias de la mano de agentes de venta comerciales (Vogel y col., 1997).

El reactor de tanque agitado es el tipo de reactor más importante de los usados a nivel industrial. En las décadas recientes, el reactor de tanque agitado no resulta útil en algunos procesos de producción debido a razones técnicas. En otros casos puede ser usado técnicamente pero no resulta provechoso económicamente. En algunos casos resulta provechoso pero son factores biológicos los que descartan el uso de este tipo de reactores.

Para desarrollar procesos más eficientes en costo, los datos para el escalamiento a nivel industrial deben ser obtenidos de repetidos y constantes experimentos en laboratorio o plantas piloto. Estos datos deberían ser extensos. Desafortunadamente, resulta más difícil obtenerlos de lo que sería en la industria

química o petroquímica. La naturaleza del trabajo con materia viva hace la contaminación común y la reproducibilidad de los datos difícil de alcanzar. Tales problemas distorsionan rápidamente los factores relevantes de escalamiento (Schügerl, 1982).

El rápido desarrollo de la biotecnología ha impactado diversos sectores de la economía en los últimos años. Nuevos procesos deben ser desarrollados para transformar las actuales investigaciones en productos viables en el mercado. Se debe poner especial atención en procesos industriales para el cultivo de células, tejidos y microorganismos.

Los ingenieros químicos aun se enfrentan con problemas respecto al escalamiento y la contaminación bacteriana en la fermentación aerobia con cultivos sumergidos. Para comprender estos problemas se debe de estudiar lo que son los biorreactores ya que en estos residen las principales dificultades encontradas (Vogel y col., 1997). Es por esto que el desarrollo de este trabajo ayudará a encontrar algunas de las dificultades que se presentan en el proceso de las fermentaciones aerobias referentes tanto al microorganismo como a problemas del biorreactor, debido a que se estudiará el comportamiento de un reactor acondicionado para este proceso y al conocerse las dificultades se implementarán soluciones específicas para cada problema.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 LA BIOTECNOLOGÍA

La biotecnología es la nueva revolución industrial. La idea que subyace en ella es sencilla: por qué molestarse en fabricar un producto cuando un microbio, un animal o una planta (los verdaderos protagonistas de la biotecnología) pueden hacerlo por nosotros. Así, se pueden lograr desde combustibles a medicinas, pasando por plásticos, alimentos, vacunas, recursos minerales, entre otros, millones de años de evolución les capacitan para ello. Existen microorganismos para todo; por ejemplo los hay que son capaces de vivir en agua hirviendo, y los que habitan en hielo, pasando por los que existen en el interior de la corteza terrestre. Son capaces de comer petróleo, madera, plástico e incluso rocas sólidas. Pero pese a todo, no siempre es fácil encontrar el organismo o célula adecuados para producir un determinado producto. No hay problema: se crean. Para ello la biotecnología cuenta con una poderosísima herramienta, la ingeniería genética. En muchas ocasiones, la propia biotecnología se confunde con ella.

En la actualidad muchos productos biotecnológicos se encuentran en contacto con nuestra vida cotidiana. Es verdad que los más célebres y comercializados son los que atañen a la salud: insulina, linfocinas, interferón, hormona del crecimiento, eritropoyetina, factores de coagulación sanguínea, múltiples vacunas (entre las que merecen destacar la de la hepatitis B y la de la malaria, ésta última aún en fase de ensayo clínico), antibióticos, vitaminas, etc.. Pero también hay insecticidas, combustibles renovables, cultivos y ganado resistente, plantas y animales mejorados en su producción, sistemas de control de la contaminación, colorantes, alimentos para ganado, etc. y muchos más que pronto se comercializarán. La prueba del brillante futuro que aguarda a la biotecnología es el que empresas como Shell, Exxon, Glaxo, Standard Oil, Unilever y muchas otras, cuentan con su propia división biotecnológica en la que

invierten grandes sumas. Pero esta es una visión optimista. La biotecnología no está exenta de interrogantes. ¿Se dedicará más atención a la salud de los habitantes de los países industrializados que a las enfermedades propias de las naciones en vías de desarrollo? ¿Provocará finalmente una catástrofe ecológica la liberación incontrolada al entorno de alguno de los organismos con los que se trabajan? ¿Son seguros todos los productos alimenticios y médicos que se generan? ¿Perderán algunas naciones el tren de la industria biológica y, de ser así, en qué medida quedarán afectadas sus economías? ¿Serán las armas biológicas usadas por los grupos terroristas en el futuro? (Prentis, 2000).

2.2 EL BIORREACTOR

El biorreactor es la parte principal de cualquier proceso bioquímico en el que se emplean sistemas de microorganismos, células animales o vegetales para la manufactura de una amplia variedad de productos biológicos de utilidad. La función principal de un biorreactor es la de proveer un medio controlado para alcanzar el crecimiento y la formación de productos óptimos para el sistema celular particularmente empleado.

El desempeño de cualquier biorreactor, depende de muchas funciones que incluyen entre otras: la concentración de biomasa (debe permanecer alta), el mantenimiento de condiciones estériles, una agitación efectiva para que la distribución de sustratos y microorganismos en el biorreactor sea uniforme, la eliminación de calor, la creación de las condiciones correctas de cizalla ya que altas velocidades de cizalla pueden dañar a los organismos pero bajas velocidades también son indeseables ya que pueden producir floculación o el crecimiento de biomasa en las paredes del biorreactor y en el agitador.

La clasificación de los fermentadores puede darse de la siguiente manera:

1. Reactores con mecanismos de agitación interna.

2. Reactores de circulación externa.
3. Reactores de columna de burbuja y de elevación con gas (air-lift).

Esta clasificación esta basada tanto en la agitación y aireación como en la relación de abastecimiento de oxígeno.

La mayoría de los procesos de fermentación son aerobios y por lo tanto requieren del suministro de oxígeno. La demanda de oxígeno en el proceso de fermentación industrial es normalmente satisfecha por aireación y agitación. Sin embargo, la productividad de muchas fermentaciones esta limitada por la disponibilidad de oxígeno, por lo tanto es importante considerar los factores que afectan la eficiencia del fermentador para abastecer a las células microbianas de oxígeno.

El oxígeno es suministrado normalmente al cultivo microbiano en forma de aire, esto proporciona una fuente de gas lo más barata posible.

La velocidad de transferencia de masa es directamente proporcional a la fuerza impulsora debida a la diferencia de concentraciones, el flujo másico de oxígeno puede expresarse como en la ecuación número 1:

$$J_{O_2} = K_L (C^* - C_L) \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

J_{O_2} = Velocidad de transferencia de masa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

K_L = Coeficiente global de transferencia de masa ($\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$).

C^* = Concentración de equilibrio en el líquido ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

C_L = Concentración del gas en el líquido ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

La transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al microorganismo suspendido en la dispersión gas líquido se efectúa a lo largo de una ruta definida Figura 2.1.

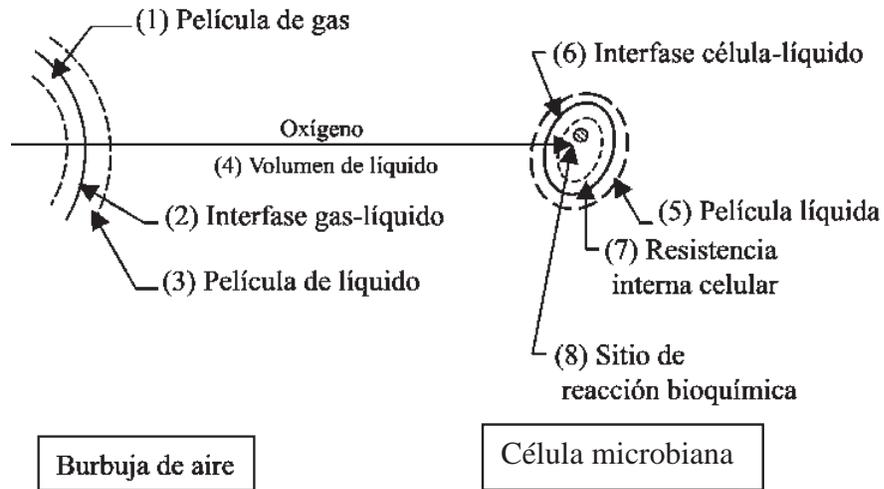


Figura 2.1. Resistencias a la transferencia de masa.

La ruta de transporte más general es a través de las siguientes resistencias (Lee, 1991):

1. En la película de gas al interior de la burbuja.
2. En la interfase gas-líquido.
3. En una película líquida de la interfase gas-líquido.
4. En el seno del líquido.
5. En una película de líquido alrededor de la célula.
6. En la interfase célula-líquido.
7. La resistencia celular interna.
8. La resistencia en los sitios de reacción bioquímica (Lee, 1991).

2.2.1 AGITACIÓN Y MEZCLADO DE FLUIDOS Y NECESIDADES DE POTENCIA

La agitación se refiere a forzar un fluido por medios mecánicos para que adquiera un movimiento circulatorio en el interior de un recipiente, durante esta operación los movimientos sobre el material son de tipo irregular y turbulento.

En el mezclado intervienen dos fases, como puede ser un líquido y un sólido o dos líquidos; la finalidad de esta operación es lograr que ambas fases se distribuyan entre sí.

La agitación acelera algunas operaciones como el mezclado, la absorción, la transferencia de calor, la extracción y algunas reacciones.

2.2.2 TIPOS DE AGITACIÓN

Los tipos de agitación son:

- Entre líquidos poco viscosos.
- De líquidos y suspensiones.
- De líquidos muy viscosos y sólidos secos pulverizados.

Según las necesidades que se tengan que satisfacer con la agitación, se distinguen cuatro tipos de operaciones que requieren un equipo distinto de agitación. Esas operaciones son:

1. Transferencia de materia en sistemas homogéneos.
2. Mezcla de líquidos.
3. Formación de emulsiones.
4. Transferencia de calor y uniformidad de temperatura.

Los objetivos de la agitación pueden ser:

- Poner en suspensión partículas sólidas.
- Dispersar burbujas en el seno del líquido.
- Dispersar un líquido en otro no miscible con él para formar una emulsión o una suspensión.
- Disolución de sólidos en líquidos.
- Agitación de un fluido para aumentar la transferencia de calor entre el líquido y un serpentín o una chaqueta alrededor de un recipiente.

2.2.3. TIPOS DE FLUJO EN TANQUES AGITADOS

El tipo de flujo que se produce en un tanque agitado depende de las características del fluido, del tipo de rodete o propulsor, del tamaño y dimensiones del tanque y placas deflectoras.

El fluido durante la agitación generalmente tiene los siguientes componentes de velocidad:

1. Radial actúa en dirección perpendicular al eje del rodete.
2. Longitudinal el cuál actúa en dirección paralela al eje.
3. Rotacional que actúa en dirección tangencial a la trayectoria circular descrita por el rodete.

Las componentes radial y longitudinal son útiles para el mezclado.

Cuando el eje vertical está dispuesto en el centro del tanque, la componente tangencial es perjudicial para el mezclado ya que este flujo sigue una trayectoria circular alrededor del eje creando un vórtice en la superficie del líquido, además si la circulación del líquido es flujo laminar, se produce una estratificación de las sustancias sin mezclar.

Cuando existen partículas sólidas, estas son lanzadas contra la pared del tanque por la fuerza centrífuga, lo que provoca que caigan acumulándose en el centro del fondo del tanque. Existen varias maneras de evitar el flujo tangencial y favorecer el mezclado, la más común es colocar placas deflectoras.

Otra manera de evitar la formación de remolinos en tanques pequeños es por medio de la colocación del rodete fuera del centro del tanque, ya sea con inclinación o sin ella. Por otro lado para los tanques grandes se recurre a montar el rodete en la parte lateral del tanque de manera horizontal pero con cierto ángulo respecto al radio. Lo anterior no sería necesario si se dispone de agitadores tipo turbina ya que a estos puede implementárseles anillos difusores. Finalmente el vórtice también se puede evitar llenando por completo el tanque.

2.2.4 AGITADORES

Una vez eliminados los remolinos el tipo de flujo depende del rodete o impulsor usado. La elección del impulsor para que produzca el tipo de flujo deseado se hace entre los modelos de corriente axial y corriente radial.

Los principales tipos de agitadores son:

- De hélice.
- Turbina.
- Banda helicoidal.

2.2.4.1 AGITADORES DE HÉLICE

Proporcionan un patrón de flujo axial, son útiles en la agitación de líquidos poco viscosos, alcanzan velocidades entre 400 y 1750 rpm. Es conveniente usar este tipo de impulsor cuando hay partículas sólidas que deban levantarse del

fondo. Las hélices descargan el líquido hacia abajo, disminuyendo en velocidad conforme irradian hacia la pared.

2.2.4.2 AGITADORES DE PALETAS

Trabajan a velocidades de 20 a 200 rpm y se tienen sistemas de 2 a 4 paletas. Cuando son empleados a bajas velocidades se obtiene una agitación suave sin deflectores. Este tipo de agitador no es efectivo con sólidos en suspensión porque proporcionan poco flujo axial. Es recomendable para velocidades bajas de transferencia de masa (González, 2000).

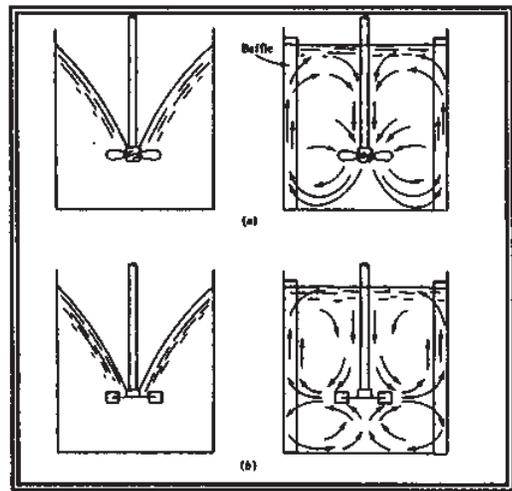


Figura 2.2. (a) Patrón de flujo en un tanque con deflectores y la hélice colocado en el centro del tanque. (b) Patrón de flujo en un tanque con deflectores y el impulsor de paletas colocado en el centro del tanque.

2.2.4.3 AGITADORES DE TURBINA

Se caracterizan por que:

- a) Tienen paletas múltiples cortas.
- b) Proporcionan poco flujo axial.
- c) Se utilizan en operaciones como la dispersión de un gas en un líquido.

La turbinas de paletas inclinadas con las aspas a 45°, imparte flujo axial, de manera que hay una combinación de flujo axial y radial. Entonces son útiles para sólidos en suspensión, ya que las corrientes fluyen hacia abajo y luego levantan los sólidos depositados.

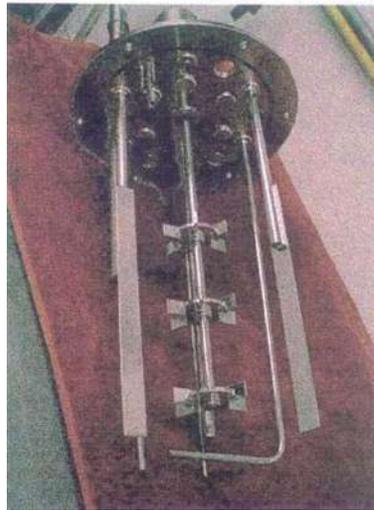


Figura 2.3. Propelas Rushton. Sistema de agitación.

2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son compuestos resultado de la fermentación de microorganismos que no se producen durante la primera fase de crecimiento, sino cuando el cultivo entra en la fase estacionaria. Éstos son algunos de los productos de mayor importancia por su aplicación industrial y es muy importante conocer su naturaleza para el desarrollo de nuevos procesos. Además presenta

diferencias marcadas de un organismo a otro. Se han reconocido las siguientes características de los metabolitos secundarios:

- Relativamente pocos microorganismos dan lugar a la formación de metabolitos secundarios.
- Parece ser que los metabolitos secundarios no son indispensables para el crecimiento y la reproducción.
- La formación de metabolitos secundarios es sumamente dependiente de las condiciones de crecimiento, en particular de la composición del medio. Es frecuente la represión de la formación de metabolitos secundarios.
- Los metabolitos se suelen producir como un grupo de sustancias estrechamente relacionadas.
- Se puede obtener una sobreproducción notable de metabolitos secundarios, mientras que los metabolitos primarios no se sobre producen de una forma tan notable.
- En los organismos productores que tienen un sistema inmune, producen metabolitos secundarios, por lo que se cree que actúan como un mecanismo de defensa alternativo.
- Muchos de estos productos tienen actividad fisiológica.

2.4 *Gibberella fujikuroi* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios producidos por *Gibberella fujikuroi* son de gran utilidad en diversos campos de la ciencia como: la agronomía, botánica y medicina principalmente. En la agronomía las giberelinas, como son conocidos estos metabolitos secundarios, son empleados para acelerar el crecimiento de algunas plantas aplicándolo en pequeñas concentraciones y en la etapa adecuada de desarrollo de la planta; también ayudan a mejorar el aspecto de los frutos. En la medicina actualmente se esta trabajando con estos metabolitos con el fin de

desarrollar medicamentos para el tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus.

Las *giberelinas* son hormonas vegetales (se encuentran dentro de los 5 grupos de reguladores de crecimiento: Citocininas, Auxinas, Ácido abscísico, Etileno y Giberelinas) que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican el proceso fisiológico vegetal, obteniendo mejoras en el desarrollo de estos. El estudio de las *giberelinas* empieza con el reporte acerca del Bakanae, enfermedad que se presenta en la planta del arroz en oriente, que provoca el crecimiento del tallo.

Al estado imperfecto del hongo se le llama *Fusarium moniliforme*. Al estado perfecto sexual se le llama *Gibberella fujikuroi*.

A partir de la primera giberelina se han identificado una gran variedad de giberelinas detectados en el producto metabólico del *Gibberella fujikuroi*.

Las giberelinas se denominan trivialmente GA_1, \dots, GA_n de acuerdo al orden cronológico de identificación y no a su actividad biológica (Tudzynski, 1999) citado por Negrete (2002).

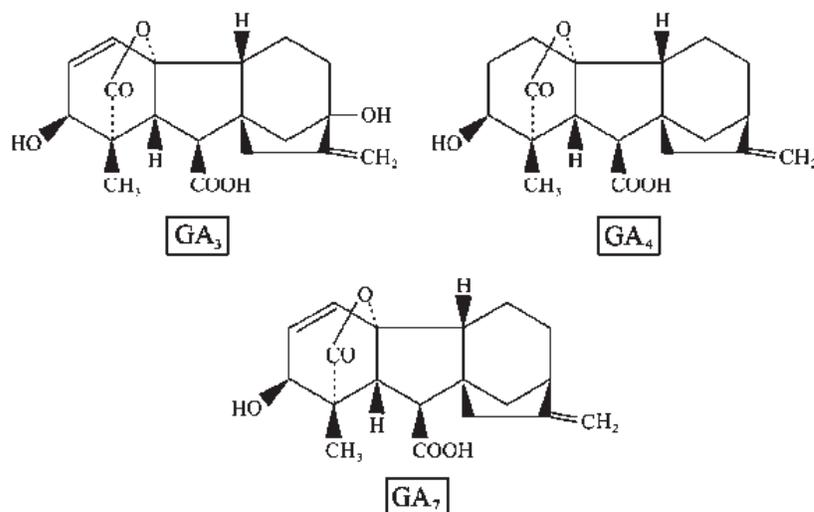


Figura 2.4. Estructuras de las giberelinas GA₃, GA₄ y GA₇.

2.4.1 QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN DE LAS GIBERELINAS

Las giberelinas son un grupo de diterpenoides con un anillo tetraédrico llamado ent-giberelina.

Se han identificado 121 giberelinas de fuentes naturales la GA₃ (ácido giberélico) es la más representativa (Brückner y Blechschmid, 1991).

Las giberelinas se clasifican de la siguiente manera:

- C₁₉. Perdieron biosintéticamente un átomo de carbono.
- C₂₀. Con 20 átomos de carbono.

2.4.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS GIBERELINAS

El principal efecto es el alargamiento de los tallos de las plantas. También inducen la producción de amilasa, rompen el letargo de las semillas y promueven la floración en plantas jóvenes.

La tercera parte de las giberelinas son fisiológicamente activas en las plantas.

La acción de las giberelinas es más notable en plantas enanas. La aplicación a este tipo de plantas es un método para determinar biológicamente las giberelinas. Estas acciones las provoca el incremento en la división celular, el número de raíces, expansión celular.

2.4.3 OBTENCIÓN DE GIBERELINAS

1. Síntesis química.
2. Extracción de plantas.
3. Fermentación microbiana.

La síntesis química no es utilizada por que requiere reactivos muy costosos.

En la extracción de plantas la cantidad de GA₃ en las hojas es muy baja. Las cantidades de GA₃ en las partes reproductoras (semillas y tallos) son grandes.

La extracción se hace por maceración del tejido con metanol y enseguida la partición de giberelinas libres con acetato de etilo a un pH de 2.5. Este método no es viable económicamente por la baja concentración.

La fermentación microbiana es el método más factible de producción. La optimización de la concentración inicial de carbono y nitrógeno incrementan la producción. La técnica más empleada es fermentación en cultivos sumergidos con cepas mejoradas (Brückner y Blechschmid, 1991; Tudzynski, 1999).

2.4.3.1 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GIBERELINAS

Las giberelinas son producidas principalmente por el hongo *Gibberella fujikuroi*.

También pueden ser producidas por levaduras y bacterias, de acuerdo a la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Giberelinas producidas por microorganismos.

GA _s	Clase:	P.M.	Fuente	Referencia
GA ₁	A	344	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Stodola et al. (1955), Grove et al. (1958).
GA ₂	A	346	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Takahashi et al. (1955). Grove (1961).
			<i>Gibberella fujikuroi</i>	Cros (1954), Stodola et al.(1955),
			<i>Neurospora crassa</i>	Kawanabe et al. (1983).
GA ₃	A	346	<i>Fusarium moniliforme</i>	Gancheva et al. (1984), Gohlwar et al. (1984).

2.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN

Al igual que los seres vivos, los microorganismos nacen, crecen, se reproducen, mueren y además segregan algunos compuestos bioquímicos importantes para el hombre.

Para producir *giberelinas* el microorganismo rentable económicamente es el hongo *Gibberella fujikuroi*.

El medio debe de estar balanceado, lo que significa que los nutrientes se agotan en el mismo tiempo, por lo que la relación carbono/nitrógeno es importante.

2.5.1 FACTORES NUTRICIONALES

A. Macronutrientes.

B. Micronutrientes.

El agua es entre el 80-90% peso celular total, debe de haber bastante en el medio.

2.5.1.1 CARBONO

El carbono constituye el esqueleto de toda molécula orgánica. Representa el 45-50% del peso celular en base seca y se debe proporcionar en abundancia en el medio de cultivo.

La fuente de carbono más empleada para producir giberelinas es la dextrosa.

2.5.1.2 NITRÓGENO

Constituye entre el 10-15% del peso celular en base seca. Existen fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas; entre ellas sulfato de amonio, cloruro de amonio que a bajas concentraciones resultan excelentes para altos rendimientos.

Algunas fuentes de nitrógeno ligeramente asimilables como: glicina, tartrato de amonio, harina de plantas combinadas con sulfato o cloruro de amonio y licor de maíz.

2.5.1.3. LAS SALES MINERALES Y TRAZAS DE ELEMENTOS

Las sales minerales representan un 4-5% de peso celular en base seca.

El P, S, K, Mg, Na, Fe son macronutrientes necesarios para el crecimiento microbiano.

Los oligoelementos son micronutrientes indispensables para la nutrición del microorganismo. El Fe, Cu, Mn, Zn, B, Al y Ca, se requieren durante la fermentación para la producción de giberelinas.

Lo principal al preparar un medio de cultivo es obtener la mezcla equilibrada de nutrientes a concentraciones que permitan el buen crecimiento.

2.5.2 CONDICIONES FISICOQUÍMICAS DE CULTIVO NECESARIAS

Los factores como pH, temperatura y aireación/agitación influyen en la producción de una, dos o varias giberelinas.

2.5.2.1 TEMPERATURA

La variación de la temperatura afecta cualitativa y cuantitativamente el crecimiento y formación del microorganismo.

La temperatura óptima para la producción de giberelinas es 29°C. Se reporta que la temperatura óptima para el crecimiento es entre 31-32°C.

2.5.2.2 pH

La fuente de nitrógeno determina el pH inicial del medio.

La composición de la mezcla de giberelinas producidas depende del pH. A un pH de 2 a 5 se produce GA₃, a un pH superior de 5.5 se producen otras giberelinas como GA₄/GA₇ (Negrete, 2002).

2.5.2.3 AIREACIÓN Y AGITACIÓN

Para producir GA₃ la aireación/agitación debe ser tan vigorosa como sea posible.

El oxígeno es poco soluble en agua. Un biorreactor con población microbiana grande tiene una alta demanda de oxígeno. Mientras el biorreactor es más grande se incrementa la relación superficie/volumen, y se dificulta la transferencia de oxígeno.

El mezclado y la aireación remueven el dióxido de carbono y otros productos tóxicos para las células. Para resultados óptimos en una fermentación se debe mantener una concentración de saturación de oxígeno disuelto en el medio.

Los microorganismos cultivados en biorreactores están expuestos a diferentes tipos de estrés. La producción de un metabolito o producto de interés está determinado principalmente por las condiciones o parámetros fisicoquímicos y nutrientes existentes en el biorreactor.

A continuación se mencionan algunas consideraciones importantes para el diseño de un biorreactor.

- A. No tener zonas muertas; mantener un medio homogéneo.
- B. Transferencia de oxígeno al medio efectiva.
- C. Mezclado y patrones de flujo con mínimo esfuerzo.
- D. Configuración geométrica y tipo de reactor.
- E. Consumo mínimo de energía, por lo tanto bajos costos.

El biorreactor de tanque agitado es el que se emplea en operación a gran escala, en fermentaciones aerobias y anaerobias.

La agitación mecánica y la aireación son efectivas para:

1. Suspensión de células.
2. Oxigenación.
3. Mezclado del medio.
4. Transferencia de masa.

El sistema de agitación mantiene el medio homogéneo pero consume mucha energía y puede dañar las células sensibles al esfuerzo de corte. El esfuerzo de corte del fluido en el mezclado se produce por los gradientes de velocidad componentes, de la velocidad tangencial y radial del fluido que parten de la región del impulsor.

Los principales objetivos del mezclado son:

- Homogenizar el medio.
- En la fermentación aerobia dispersar las burbujas de aire.
- Incrementar la transferencia de masa y calor en el medio de cultivo.

Los requerimientos de oxígeno por las células varían según el microorganismo en orden de 1 g/l h.

Las turbinas Rushton, son las más efectivas para la transferencia de oxígeno pero no son ideales para medios no newtonianos.

Los problemas de mezclado y transferencia de masa se complican, ya que los medios son complejos por los nutrientes sobre todo cuando se utilizan aceites o harinas como fuentes de nitrógeno debido a que se producen varias fases. También algunos microorganismos provocan un aumento en la viscosidad y se adquieren características no-newtonianas.

El oxígeno disuelto (OD) es la cantidad de oxígeno en una cantidad de agua o medio. La solubilidad de oxígeno o valor de saturación, es el límite de cuanto oxígeno puede disolverse en agua o medio antes de ser saturado, depende de la presión de oxígeno en el aire, temperatura y composición del medio.

2.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La descripción cuantitativa a través de modelos matemáticos de las cinéticas de fenómenos que ocurren en un bioproceso es uno de los ejes principales de la labor del ingeniero de bioprocesos. Los modelos cinéticos permiten no solamente predecir el comportamiento de un bioproceso sino que son también una herramienta fundamental para idear sistemas y equipos, así como sus modos de operación y control respectivos. Además, el diseño de experimentos y la interpretación de los resultados pueden mejorarse mediante el uso de dichos modelos, lográndose con esto un entendimiento más profundo y riguroso de los procesos celulares y fisicoquímicos participantes. Por su importancia, las cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y la formación de producto casi siempre forman parte de los modelos básicos que describen un cultivo (Bolívar, 2004).

En la Figura 2.5 se muestra la curva hipotética para una cinética de crecimiento microbiana (Quintero, 1981).

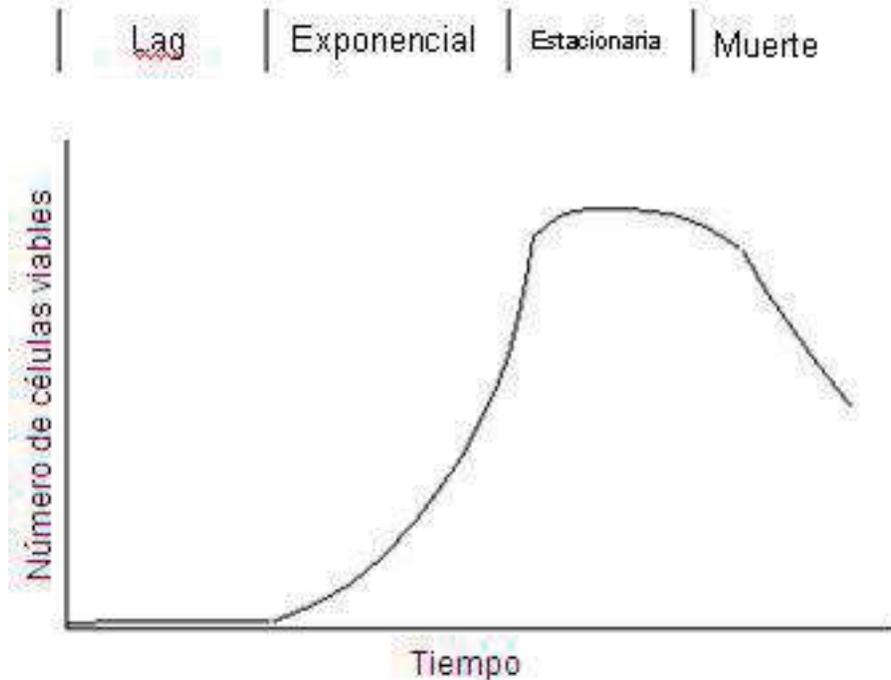


Figura 2.5. Fases del crecimiento microbiano.

2.6.1 FASES DE CRECIMIENTO

2.6.1.1 FASE DE LATENCIA

La fase de latencia o fase lag, es la fase de adaptación del hongo al medio de cultivo en el que se desarrollará, no es detectable en un medio limitado de nitrógeno, ya que la cepa requiere de muy poco a ninguna adaptación, y el crecimiento comienza rápidamente debido al uso de las células miceliales con crecimiento vigoroso como inóculo. Esta fase es detectable cuando se usa un medio de acetato de amonio o un medio rico en carbohidratos que contienen más del 30% en glucosa.

2.6.1.2 FASE EXPONENCIAL

Es un periodo de crecimiento exponencial en el cual el consumo de nutrientes es directamente proporcional a la acumulación de peso seco y se extiende hasta el momento en que se agota la fuente de nitrógeno o algún otro nutriente, involucra un periodo de rápido crecimiento y consumo de nutrientes. El crecimiento es exponencial en las fases iniciales, y posteriormente lineal debido a los cambios provocados por la restricción de oxígeno. La morfología y composición de las hifas permanece constante y no existe la producción de ácido giberélico.

En un medio limitado con fosfato y magnesio, la limitación de nutrientes ocurre antes de que comiencen las restricciones de oxígeno. Consecuentemente la reserva intracelular de fosfato ácido-soluble o Mg, permite mayor proliferación de las células. Cambia la composición micelial. El consumo de nutrientes sigue y el peso micelial seco incrementa proporcionalmente, sin embargo la velocidad de crecimiento y consumo de nutrientes son menores. El incremento de contenido de carbohidratos y grasas de las células es continuo en esta etapa hasta el agotamiento de la glucosa en el medio.

2.6.1.3 FASE ESTACIONARIA

Esta fase comprende el periodo en el que el peso micelial es máximo y la biomasa se mantiene constante hasta que la fuente de carbono y las reservas del hongo son agotadas. La producción de ácido giberélico alcanza su máximo valor.

2.6.1.4 FASE TERMINAL

La fase terminal esta caracterizada por incrementarse la vacuolación y pérdida del contenido celular presentando un decremento en el peso seco, existe

ruptura de las hifas que provoca la liberación fosfato, amonio, magnesio y potasio micelial al medio, incrementando los valores de pH.

2.6.2 MODELOS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Es importante entender la cinética de crecimiento microbiano para el diseño y operación de fermentación. La cinética celular es resultado de reacciones químicas bioquímicas y fenómenos de transporte, los cuales involucran en muchas ocasiones múltiples fases y sistemas multicomponentes (Bailey y Ollis, 1986; Lee, 1991).

Los modelos empleados para describir el crecimiento microbiano se dividen en modelos no estructurados y estructurados. Los modelos no estructurados son simples basados en la concentración de biomasa obtenida en el proceso. Los modelos estructurados involucran las posibles causas de la variación de biomasa y suponen que puede ser causado por:

- Pérdida de plásmidos.
- Inducción y represión de genes.
- Variación de contenido de RNA de las células.
- Variación de contenido de enzimas en las células.
- Cambios morfológicos.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Ecuación (2)

Donde:

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

x = Biomasa (g/l).

t = Tiempo (h).

El crecimiento microbiano puede ser modelado con diferentes grados de complejidad. El tipo de modelos más utilizados son los modelos no estructurados, en los cuales se considera que, para representar el cambio fisiológico de una población de microorganismos basta tomar en cuenta su velocidad específica de crecimiento, lo que puede representarse como una función sencilla de la composición del medio de cultivo.

Para la descripción de los modelos de cinética sencillos, se hacen frecuentemente las siguientes consideraciones:

- Buen mezclado en el fermentador, condiciones homogéneas.
- No hay muerte celular.
- Se puede ignorar la producción de etanol.
- Se consideran como substratos de importancia el carbono y el nitrógeno.
- Se provee oxígeno en exceso del requerido para el metabolismo y producción de energía (Negrete, 2002).

2.7 JUSTIFICACIÓN.

Actualmente, debido a la necesidad de formar Ingenieros Químicos con perfil en el área de bioprocesos se observa que esta área no puede comprenderse totalmente si se estudia de una manera teórica, que es como se imparte en nuestra facultad actualmente, ya que la mayoría de los conceptos que maneja esta nueva rama son prácticamente desconocidos para un alumno del quinto módulo.

Por tal motivo, es necesario implementar prácticas que complementen la clase teórica de ésta materia. Sin embargo, debido a que no se cuenta en la facultad con el equipo necesario para poder llevar a cabo alguna práctica representativa que pueda ilustrar los conceptos estudiados en clase y adquirir un equipo de fermentación completo en el mercado representaría un gasto realmente

elevado. Partiendo de lo anterior, se adaptaron los accesorios necesarios a un reactor de tanque agitado existente en la facultad, lo que representa una inversión considerablemente menor y cubre las necesidades anteriormente mencionadas.

2.8 OBJETIVO GENERAL

Acondicionar el reactor de tanque agitado de la marca Ace Glass de 7 l. que se encuentra en el Laboratorio de Electroquímica e Investigación en el edificio “E” de la Facultad de Ingeniería Química para poder realizar fermentaciones aerobias.

2.8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Adecuar los equipos con los que cuenta el reactor y acondicionarle el equipo que requiera para su funcionamiento.
- Elaborar el manual de funcionamiento del reactor.
- Realizar fermentaciones aerobias, caso de estudio: producción de giberelinas (metabolitos secundarios) por medio del hongo *Gibberella fujikuroi*.

2.9 HIPÓTESIS

El presente trabajo de tesis, pretende que el reactor tanque agitado con que cuenta la Facultad de Ingeniería Química, opere en óptimas condiciones y que sea posible realizar fermentaciones aerobias. Esto a su vez se derivaría en un mejor desempeño y aprendizaje de los alumnos que cursen la materia de biotecnología.

CAPÍTULO III

DESARROLLO DEL TRABAJO

El desarrollo del presente trabajo se realizó en dos partes la primera consistió en la revisión del reactor y posteriormente acondicionarlo para su uso. La segunda parte consta de la realización de fermentaciones para la comprobación del adecuado funcionamiento del reactor.

3.1 ACONDICIONAMIENTO Y MONTAJE DEL REACTOR



Figura 3.1. Reactor de tanque agitado marca Ace Glass.

La Figura 3.1, muestra las condiciones en que se encontraba el reactor en el laboratorio, por lo que se plantearon las necesidades que deberían cubrirse para realizar las fermentaciones aerobias, llegando a la conclusión que era necesario:

- Una alimentación de aire para el medio de cultivo.
- Una alimentación de aire para la agitación.
- Un medidor de pH.
- Un medidor de Temperatura.
- Una válvula toma de muestra.

3.1.1 ALIMENTACIÓN DE AIRE PARA EL MEDIO DE CULTIVO

Para alimentar el aire al reactor se utiliza aire comprimido por lo que se compro un compresor de 40 kg de capacidad con un motor de 1 caballo de fuerza.

Como es de esperarse para que el aire pueda estar en contacto con el medio de cultivo debe de estar libre de impurezas y cualquier traza de aceite que pueda arrojar el compresor para esto se instaló un filtro de aire en la línea que va del compresor al difusor.

Para introducir el aire al reactor se requiere un difusor con las siguientes características: 40 cm de largo, de manera que se ubica por debajo de la propela, 10 cm en línea horizontal y orificios de 1 mm de diámetro.

Para medir el flujo de aire que entra al medio se empleará un rotámetro marca Cole-Parmer.

3.1.2 AGITACIÓN

Este reactor cuenta con un agitador con una propela de 8 paletas que es impulsado con un motor de aire al que se le acondicionó el mismo compresor que se compro para la alimentación al difusor. Para poder utilizar el mismo compresor se le instalo un divisor a la salida, así se cubren las dos necesidades sin tener que conectar a la instalación eléctrica dos compresores.

Para controlar las revoluciones por minuto (rpm) se mantiene estable la presión de salida del compresor y con la carta del motor del agitador se mide la cantidad de rpm.

3.1.3 pH

En las fermentaciones se trabajo con pH libre, por lo tanto se instaló un sensor para medir el pH que se compró directamente con el distribuidor el cuál se conectará a un potenciómetro marca Corning.

3.1.4 TEMPERATURA

En cuanto a temperatura se refiere se cubrieron los siguientes aspectos.

3.1.4.1 CALENTAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO

Para cubrir las necesidades de calentamiento del medio se utilizo la chaqueta de calentamiento con la que cuenta el reactor, a esta chaqueta se le instaló un baño termocirculador de la marca PolyScience modelo 9112. Este baño trabaja con agua destilada y se conecta a la chaqueta del reactor por medio de tuberías de plástico, ya que las temperaturas que se manejaran no son muy elevadas y el plástico las resiste, el baño cuenta con sistema de bombeo lo que asegura la circulación constante y la temperatura uniforme en toda la chaqueta. Este sistema de calentamiento cuenta con un control automático con lo que se asegura una temperatura constante.

3.1.4.2 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA

Para la medición de la temperatura en el laboratorio se cuenta con un lector de la marca Ace Glass al que se tuvo la necesidad de adaptársele un termopar tipo J de 30 cm de longitud, que se mando fabricar con el proveedor. Para poder

instalar el termopar en el reactor también se mando fabricar un termopozo de acero inoxidable pues el termopar no puede estar en contacto directo con el medio, por que los ácidos producidos por el microorganismo pueden dañarlo.

3.1.5 ALIMENTACIÓN DEL REACTOR Y TOMA DE MUESTRAS

De acuerdo a las necesidades de tomar muestras de manera periódica durante el transcurso de las fermentaciones, se diseño y mando hacer un toma muestra de acero inoxidable. La alimentación del medio y hongo se realizó por el toma muestra instalado, esto ayudado mediante una bomba peristáltica.

3.2 FERMENTACIONES AEROBIAS

Una vez que el reactor se encuentra en condiciones de operar, es necesario realizar fermentaciones para comprobar su buen funcionamiento. El caso de estudio fue la obtención de metabolitos secundarios por medio de la fermentación del hongo *Gibberella fujikuroi*. En este trabajo se utilizó el hongo *Gibberella fujikuroi* cepa CDBB-H984, el cual se mantuvo en medio PDA (agar de papa y dextrosa) no comercial a 4 °C y resembrada cada dos meses (Colección de cepas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México) empleando una campana de flujo laminar. El micelio joven aéreo es de color blanco algodonoso mientras que el micelio vegetativo presenta pigmentaciones violetas (Chávez, 2005).

3.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Con la finalidad de probar la eficiencia en el acondicionamiento del reactor, se realizaron tres fermentaciones, estudiando en ellas la influencia de la concentración del medio de cultivo. Para tal efecto se prepararon 700 ml de medio de cultivo en el que se llevó a cabo la inoculación del hongo para cada fermentación. La preparación del inóculo es una secuencia que debe hacerse días

antes de que se tenga planeado comenzar la fermentación. El inóculo es lo que se puede llamar el semillero a partir del cual crecerá el hongo que se alimentará al reactor para llevar a cabo la fermentación.

3.2.1.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL INÓCULO

En la Tabla 3.1 se muestran las cantidades y los compuestos que contiene el medio para el inóculo empleado en las fermentaciones realizadas (Chávez, 2005).

Se coloca todo en un matraz y se disuelve poco a poco con agua destilada, hasta aforar al volumen que se desea preparar.

Tabla 3.1 Preparación del medio de cultivo para el inóculo.

Cantidad	Compuesto
30 gr/L.	Dextrosa
2.5gr/L.	Nitrato de amonio (NH_4NO_3)
0.5 gr/L.	Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
0.1 gr./L.	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
2 ml./L.	Solución de oligoelementos.
700 ml	Agua.

3.2.1.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ISOTÓNICA

Se pesa la cantidad necesaria de NaCl dependiendo del volumen que se va a preparar, la solución debe de estar al 0.9% de NaCl. Generalmente se preparan 50 ml.

3.2.1.3 ESTERILIZACIÓN

La esterilización es la eliminación por remoción o muerte de todos los microorganismos y la desactivación de virus. El mantenimiento de condiciones estériles es fundamental en el desarrollo microbiológico y se requiere en muchas fermentaciones industriales. Las condiciones estériles son esenciales en el uso de cultivos puros y esto involucra que la esterilización sirve para prevenir el crecimiento de organismos indeseables.

En el desarrollo del presente trabajo se realizaron diversas esterilizaciones, como en la etapa de la preparación del inóculo y del medio de cultivo, cuya finalidad es eliminar cualquier impureza presente en el agua y los materiales usados, de manera que no se vea afectado el crecimiento del hongo. Una vez que se descarga el reactor cuando concluye la fermentación el caldo resultante debe ser esterilizado para poder manejar los residuos y poder desecharlos

Las esterilizaciones se realizaron en una autoclave de la marca Felisa de 40 litros de capacidad.

Se preparan los matraces donde se encuentra el medio de cultivo y la solución isotónica para su esterilización. A los matraces se les colocan tapones, estos a su vez son cubiertos con papel aluminio y cinta adhesiva, a los matraces se les coloca una tubería de silicón por la que se le suministrará aire al medio. Para la esterilización se preparan una pipeta y una espátula, envolviéndolas con papel estraza y cinta adhesiva.

A todo el material se le coloca un poco de cinta testigo para confirmar su esterilización. Enseguida se coloca en la canastilla de la autoclave y se esterilizan a 120°C por 20 minutos.



Figura 3.2. Autoclave marca Felisa.

3.2.1.4 RESUSPENSIÓN DEL HONGO

El procedimiento para llevar a cabo este trabajo se describe a continuación.

1. Acondicionar el ambiente, es necesario mantener las condiciones estériles.
2. Verter un poco de solución isotónica sobre el hongo que se encuentra conservado en cajas de petri sobre agar sólido. Con ayuda de una espátula frotar suavemente el hongo para desprenderlo del agar y así quede suspendido en la solución.
3. Con una pipeta succionar la suspensión contenida en la caja de petri y depositarla en el matraz que contiene el medio de cultivo para el inóculo.
4. Si se considera que la caja de petri todavía contiene hongo, puede repetirse el procedimiento.

3.2.1.5. INOCULACIÓN

Después de que se tiene el hongo suspendido en el medio de cultivo para el inóculo se realiza el siguiente procedimiento.

- a. Se instala la línea de aire en el tubo difusor contenido en el matraz que contiene el hongo suspendido, los requerimientos de aire son cubiertos por un compresor de aire. Se instala un filtro pirinola para evitar contaminaciones.
- b. Se instala una trampa de cloro para evitar, en caso de una fuga, que se propague alguna espora del hongo.
- c. Se coloca el matraz dentro de un baño maría que proveerá una temperatura de 29°C.
- d. Comenzar la alimentación de aire de manera que dentro del matraz se genere una buena agitación.
- e. Mantener las condiciones de aireación y temperatura constantes por le menos 36 horas.

Para el proceso de inoculación se utilizó un compresor de aire libre de aceite para evitar cualquier contaminación. Cuenta con un tanque pequeño, sin embargo debido a que la demanda de aire no es muy alta resulta apropiado para este trabajo.



Figura 3.3. Compresor de aire.



Figura 3.4. Baño María marca Felisa.

3.2.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LAS FERMENTACIONES

La síntesis de metabolitos secundarios depende principalmente de la biomasa. Por lo tanto, la selección de los componentes del medio se basa en los aspectos de crecimiento y formación de producto. Las fuentes de carbono que más se utilizan son carbohidratos simples y aceites vegetales. Sin embargo, si la concentración inicial de dextrosa es mayor del 30 % la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de producción de giberelinas disminuyen debido a una represión catabólica.

3.2.2.1 COMPUESTOS

Para cada fermentación se prepararon 5 litros de medio de cultivo, en las cuales se uso una concentración diferente de los nutrientes y que a continuación se describe:

3.2.2.1.1 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

En la Tabla 3.2 se muestra la composición del medio de cultivo para cada una de las fermentaciones realizadas.

Tabla 3.2. Composición para cada uno de los experimentos.

Componentes	Fermentaciones		
	1	2	3
Dextrosa, g/l	30	30	50
NH ₄ Cl, g/l	0.75	0.375	0.75
KH ₂ PO ₄ , g/l	5	5	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O, g/l	1	1	1
Oligoelementos, ml/l	2	2	2
Agua, l	5	5	5

Para la preparación del medio de cultivo se procede de la siguiente manera:

1. Se pesan y se miden las cantidades deseadas de cada compuesto.
2. Cada compuesto es diluido en un litro de agua; es importante no tener en mezcla el NH_4Cl con la dextrosa debido a que pueden generar una reacción no deseada.
3. Las 5 soluciones se esterilizan en autoclave a 125°C por 20 minutos (Chávez, 2005).

3.2.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL A ESTERILIZAR

Cuando se trata de esterilizar material pequeño como puede ser una pipeta, una espátula o material pequeño se debe envolver en papel estroza utilizando cinta adhesiva para sellar bien, al envolverlo debe tomarse en cuenta que cuando se este utilizando se debe de poder destapar con facilidad.

Si se va a esterilizar algún recipiente que contenga un líquido hay que asegurarse que no se derrame el líquido dentro de la autoclave.

3.2.4. PREPARACIÓN DEL REACTOR PARA LA FERMENTACIÓN

A continuación se mencionan los pasos a seguir para la alimentación del reactor:

3.2.4.1 LIMPIEZA

El reactor debe de estar completamente limpio y estéril para que las fermentaciones no se vean afectadas por ningún tipo de contaminación, para esto es necesario desarmar el reactor y lavarlo, se deja escurrir y justo antes de volver a armarlo se esteriliza con alcohol de 70° .

3.2.4.2 ARMADO

El reactor es armado sobre una estructura metálica, lo que facilita el manejo del mismo y ahorra espacio. En el apéndice se incluye un manual de mantenimiento y limpieza del reactor.

3.2.4.3 ACCESORIOS

Después de montado el reactor, fueron colocados los siguientes accesorios:

- a. Difusor. Debe ser instalado antes de cerrar la tapa del reactor.
- b. Compresor. Se conecta a la instalación eléctrica del laboratorio, del divisor que esta a la salida del compresor se conectan dos tuberías. La primera va al motor de aire con el que funciona el agitador. La segunda línea se conecta con un reductor de diámetro a una tubería de silicón en la que esta conectado un filtro cápsula para el aire, de esta manera se asegura que el aire que entrará al difusor será aire limpio que no afectará el desarrollo de las fermentaciones.
- c. Rotámetro. El rotámetro se conecta justo en la salida del filtro cápsula, la salida del rotámetro se conecta con una tubería de silicón a la entrada del difusor, de esta manera se mide el flujo de aire que entra al medio.
- d. El sensor de pH. Se instala en una de las boquillas que se encuentran en la parte superior del reactor, se instala en una tapa con rosca especial, las boquillas del reactor son esmeriladas, se recomienda poner un poco de vaselina o algún lubricante, pero debe tenerse cuidado de que con el calor que se generara no vaya llegar a escurrir y caer en el medio ya que esto representaría una grave fuente de contaminación.
- e. Baño termocirculador. Se conecta a la entrada y salida de la chaqueta del reactor por medio de unas mangueras de plástico. Se conecta a la instalación eléctrica del laboratorio utilizando un regulador de corriente.
- f. Termómetro. Se instala el termopozo en la tapa con rosca se mando hacer para que se pudiera adecuar a una de las entradas del reactor, una vez que

el termopozo esta instalado en el reactor se llena con agua destilada, el termopar se introduce en el termopozo y se conecta al lector de temperatura.

- g. El toma muestra. Al igual que el difusor son instalados ya sea en una de las tapas de vidrio con las que cuenta el reactor o en un tapón de látex perforado y se coloca en una de las bocas del reactor.
- h. La bomba peristáltica. La bomba lleva una tubería de látex que se acomoda de acuerdo al sentido en el que se desea que la bomba succione, un extremo va conectado al tubo toma muestra y el otro a un matraz del que se desea cargar el medio o a un recipiente que recibirá el volumen de muestra deseado.

3.2.4.4 CARGA DEL REACTOR

Para cargar el reactor se cuenta con las soluciones que se prepararon y esterilizaron para formar el medio de cultivo, estas soluciones se cargaran al reactor con ayuda de la bomba peristáltica.

Una vez que están cargadas todas las soluciones que conforman el medio de cultivo se procede a la alimentación del inóculo, para esto hay que tener especial cuidado ya que no debe destaparse mucho el matraz que lo contiene para evitar cualquier posible contaminación. Debe de moverse constantemente el reactor con el fin de que la bomba peristáltica alcance a tomar la mayor cantidad de hongo posible.

3.2.5. OPERACIÓN DEL REACTOR

Con la finalidad de obtener una buena agitación y mezclado durante los experimentos, se adicionaron al reactor 5.7 litros de solución (medio de cultivo e inóculo), esto tomando de base las recomendaciones de dejar de un 10 a 20% de espacio libre en el reactor para mejorar la transferencia de masa (Quintero, 1981).

De acuerdo a la presión de salida que se manejó y se mantuvo constante en el compresor y con la consulta de la carta de diseño del motor de aire con el que cuenta el reactor para la agitación se manejo una velocidad de agitación de 400 rpm.

3.2.6 TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestra se realizó por medio de la bomba peristáltica, se utilizaron tubos toma muestra de plástico previamente esterilizados con alcohol. Las muestras se tomaron cada 24 horas durante 120 que duro la fermentación, en cada muestra se tomaban entre 25 y 30 ml ya que los análisis se determinaron por duplicado.

3.2.7 DESCARGA DEL REACTOR

Una vez que la fermentación ha terminado, se dispone a la descarga del reactor, lo primero que se hace es suspender el calentamiento y desconectar los accesorios, lo último que se suspende es la agitación de esta forma los pellets (gránulos de micelio) formados no se asentarán inmediatamente.

El reactor cuenta con una válvula de descarga en la parte del fondo, a esta salida se conecta una tubería de látex, el otro extremo se coloca en un matraz que recibirá el caldo, el matraz debe cubrirse con un tapón de algodón y manta de cielo para evitar la propagación de alguna espora del hongo. Los matraces que contienen el caldo de cultivo deben prepararse para ser esterilizados, inhabilitar el hongo y poder desechar el caldo.

Después de que ya se vació todo el caldo que contenía el reactor éste se desarma para su lavado y esterilización.

3.2.8 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

3.2.8.1 BIOMASA

Una vez que se toma la muestra se utiliza el método de peso seco. Se utilizan dos alícuotas de 10 ml el filtrado se recibe en un toma muestra para realizarle los análisis correspondientes. Una vez que se tiene las dos membranas con la muestra filtrada, se ponen a secar en una estufa a 80°C por espacio de 2 horas, una vez seca la muestra se pesa y se puede obtener por diferencias de peso la cantidad de biomasa producida al momento en que se tomó la muestra (Chávez, 2005).

3.2.8.2 IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Para comprobar que se produjeron metabolitos secundarios se realizó una prueba de cromatografía en capa fina, para esto se utilizan las muestras filtradas y se les realiza una extracción líquido-líquido.

3.2.8.2.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Para realizar la extracción se tomo un volumen de la muestra filtrada y se le añadió acetato de etilo que se utilizó como disolvente a una relación 1:2. Esta mezcla se coloca en un matraz Erlenmeyer para pasarse a una agitadora durante 15 minutos, se agrega nuevamente un poco de acetato de etilo y se pone en agitación otra vez. Se permite que se formen las dos fases, con una pipeta Pasteur se extrae la fase orgánica y se transfiere a tubos de ensaye con tapa. Después de que se obtiene la fase orgánica se deja en refrigeración y se utiliza para la cromatografía en capa fina.

3.2.8.2.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

Para poder realizar la prueba de cromatografía se necesita preparar la fase móvil, que para la identificación de giberelinas lleva los siguientes componentes: acetato de etilo, cloroformo y ácido acético en la proporción 15:5:1. También debe prepararse una solución reveladora que debe contener 5% de ácido sulfúrico y 95% de etanol (Cavell y col., 1967).

Una vez que se tienen las soluciones listas se dispone a preparar las placas de sílica-gel, debe de marcarse el punto en el que se iniciará la corrida y donde terminará. En una sola placa se pueden poner varias muestras dividiéndola equidistantemente.

Ya que se tiene todo lo necesario preparado, se procede a correr la prueba. En un vaso de precipitados se coloca la fase móvil de forma que el nivel no supere la marca que se hizo en la placa que indica donde empieza la corrida. Una vez que la fase móvil terminó de correr se retira la placa del vaso de precipitados tomándolo con unas pinzas y enseguida se le vierte a toda la placa a solución reveladora y enseguida con ayuda de una plancha de calentamiento se evapora la solución reveladora. Para observar a las giberelinas reveladas se utiliza una lámpara de luz ultravioleta.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados son reportados y analizados como sigue:

4.1 RESULTADO DEL ACONDICIONAMIENTO DEL REACTOR

Después de diversas cotizaciones y adquisición de algunos accesorios, se finalizó el acondicionamiento del reactor, operando este de manera correcta en las fermentaciones realizadas. A continuación se presenta como se cubrieron las necesidades que eran necesarias para el sistema.

4.1.1 ALIMENTACIÓN DE AIRE

Para alimentar el aire al sistema de fermentación se empleo un difusor de aire (Figura 4.1) el cuál opero correctamente una vez que fue instalado en el reactor y conectado a la línea de aire proveniente del compresor. Se obtuvo una buena cantidad de micro burbujas que ayudaron a la buena difusividad de oxígeno en la biomasa.



Figura 4.1. Difusor de aire.

4.1.2 COMPRESOR DE AIRE

En la Figura 4.2 se presenta el compresor empleado durante el desarrollo de este trabajo, este cuenta con un cabezal y un motor lo suficientemente grande

para dar un flujo de aire necesario para alimentar al medio con el difusor y para proveer también de aire al motor con el que funciona el agitador del reactor. Se presentaron algunos problemas pues fue un tanto difícil mantener constante la presión de aire de salida del compresor. También fue necesario cambiar el manómetro por uno de escala más pequeña debido a que el que tenía inicialmente no cubría las necesidades de la operación del sistema.



Figura 4.2. Compresor.

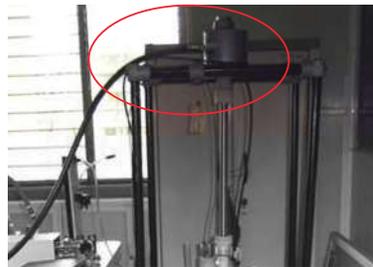


Figura 4.3. Instalación de la línea de aire para funcionamiento del motor.

4.1.3 ROTÁMETRO

El rotámetro se instaló en la tubería que alimenta el aire al medio de cultivo con la finalidad de medir la cantidad de aire que entra al sistema.



Figura 4.4. Sistema de alimentación de aire al medio.

4.1.4 FILTROS DE AIRE

Para evitar la contaminación del medio por aire sucio fue necesaria la instalación de un filtro cápsula antes del rotámetro también así, se evitará que éste se tape (Figura 4.5).



Figura. 4.5. Filtro cápsula para aire.

También se instalaron filtros pirinola en las tuberías de silicón.



Figura 4.6. Filtro pirinola instalado justo antes de la entrada al difusor.

4.1.5 ACCESORIOS PARA MEDIR pH

Como se trabajo con pH libre en las fermentaciones se instaló un sensor de pH y un potenciómetro para tener las lecturas. Se calibra al instalarlo y después las lecturas se registran para reportarse.



Figura 4.7. Potenciómetro marca Corning.



Figura 4.8. Sensor de pH.

4.1.6 ACCESORIOS DE TEMPERATURA

Con los requerimientos de calentamiento se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que se contó con un baño termocirculador (Figura 4.9) que tiene un sistema de bombeo y un control automático de la temperatura. Por instrucciones del fabricante la temperatura del baño termocirculador debe fijarse 5°C arriba de la temperatura que se desea tener en el reactor (Figura 4.10).



Figura 4.9. Baño Termocirculador.

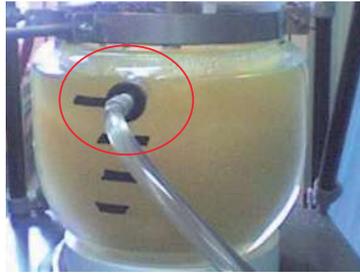


Figura 4.10. Instalación del baño termocirculador a la chaqueta del reactor.

En cuanto a la medición de la temperatura, se instaló un lector de temperatura de la marca Ace Glass (Figura 4.11), para esto se adquirió un termopar tipo “J” de 30 cm de largo y un termopozo de acero inoxidable que se instaló en una tapa con rosca especial



Figura 4.11. Termómetro marca Ace Glass.

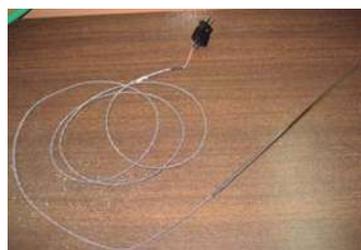


Figura 4.12. Termopar tipo J.



Figura 4.13. Termopozo.

4.1.7 EQUIPO PARA TOMA DE MUESTRA

El acondicionamiento del sistema para la toma de muestra, fue exitoso, empleando una bomba peristáltica que fue conectada al tubo toma muestra de acero inoxidable. Este mismo sistema, resultó útil, puesto que también se utilizó para la carga del reactor, cambiando el sentido de la bomba (Figuras 4.14-4.16).



Figura 4.14. Sistema de alimentación del reactor.



Figura 4.15. Tubo toma muestra.



Figura 4.16. Bomba peristáltica.

En general podemos reportar que las adaptaciones hechas al reactor fueron exitosas y que con los equipos utilizados puede el reactor operar en condiciones óptimas para la realización de fermentaciones aerobias.



Figura 4.17. Reactor de tanque agitado, acondicionado para fermentaciones aerobias.

4.2 ESTIMACIÓN DEL EQUIPO REQUERIDO PARA EL ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA DE FERMENTACIÓN AEROBIA

Después de la realización de las fermentaciones se comprueba, que con la adaptación de los accesorios empleados durante el desarrollo del presente trabajo, queda acondicionado el reactor de tanque agitado para realizar fermentaciones aerobias, para ello, a continuación se presenta el material adquirido, así como el estimado de la cotización de los equipos por adquirir.

Tabla 4.1 Equipo adquirido.

EQUIPO	PRECIO + I.V.A. (Moneda Nacional)	MARCA	PROVEEDOR
Compresor. 40 kg.	2,400.00		Bombas y compresores de Morelia.
Sensor de pH para bioreactor de 7 litros.	4,730.00	Applikon	Instrumel S. A. de C.V.
Cable para sensor de pH	1,617.00	Applikon	Instrumel S. A. de C.V.
Tubería de silicón No. 16.	741.00	Master- flex	Instrumel S. A. de C.V.
Filtros desechables 0.2 micras. Paquete con 10 piezas.	1,230.00	Applikon	Instrumel S. A. de C.V.
Filtro cápsula alto flujo 0.2 micras.	1,116.00	Applikon	Instrumel S. A. de C.V.
Tapas para boca esmerilada.	80.00	Vidritec	Vidritec
Toma muestra de acero inoxidable.	250.00	Silis	Silis-Celaya, Gto.
Total	12,214.00		

En la Tabla 4.2, se presentan las cotizaciones de equipo necesario para la realización del presente trabajo.

Tabla 4.2. Cotización de equipo probado.

EQUIPO	PRECIO + I.V.A (Dólares)	MARCA	PROVEEDOR
Bomba peristáltica con cabezal.	600.00	Master-flex	EQUIPAR
Rotámetro	279.00	Cole-Parmer	EQUIPAR
Baño termocirculador	2,800.00	Cole-Parmer	EQUIPAR
Total	3,679.00		

Con una tasa de cambio de 10.90 M.N. por dólar se tiene de lo estimado en la Tabla 4.1 y 4.2 se obtiene un total de 52,315.10 pesos, siendo un menor costo al acondicionar el equipo, comparado con el precio del sistema de fermentación completo que consta de: Biocontrolador (para control de pH, temperatura y oxígeno disuelto) y Bioconsola (control de Baño termocirculador, flujo de aire y bombas peristálticas) con un precio en el mercado de 49,873.00 dólares, para un reactor de 7 litros marca Applikon precio 2006, con el proveedor Instrumel.

4.3 RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES AEROBIAS

Una vez acondicionado el reactor se procedió a la realización de las fermentaciones. En este trabajo se empleo para el casos de estudio el hongo *Gibberella fujikuroi* para la producción de uno de sus metabolitos secundarios llamados giberelinas. Los resultados se reportan a continuación.

4.3.1 FERMENTACIÓN 1

Durante el desarrollo de la fermentación se obtienen muestras cada 24 horas, lo que permite evaluar la producción de biomasa mostrando un adecuado crecimiento del hongo.

A partir de las muestras tomadas durante la fermentación y el procedimiento descrito en el capítulo III del desarrollo del trabajo, se obtuvieron los datos que permiten obtener la curva o cinética de crecimiento presentada en la Figura 4.18.

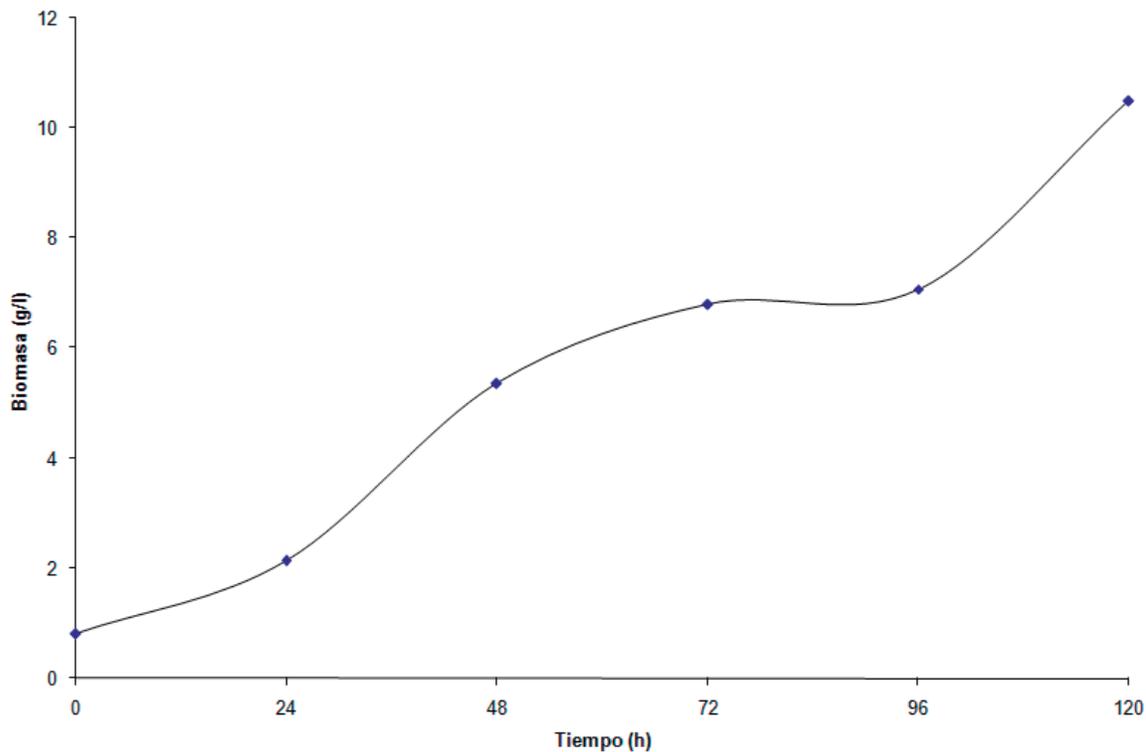


Figura 4.18. Cinética de crecimiento. Fermentación 1.

En la Figura 4.18 se observa que en la fermentación 1 se presentó el desarrollo de los microorganismos y que se tiene una producción de biomasa de 10 g/l a las 120 horas. Teniendo que no se observa la forma de una curva

característica de cinética microbiana, debido a que no se aprecian las fases de crecimiento, es decir, no se llega a la fase estacionaria, esto debido en parte a la concentración de nitrógeno, que es el nutriente que limita el crecimiento, y al posible efecto del pH, esto porque se sabe que los hongos crecen a pH de 3.0 a 7.0 (Quintero, 1981).

Para mostrar el comportamiento de la fermentación, se incluye una gráfica del comportamiento del pH (Figura 4.19).

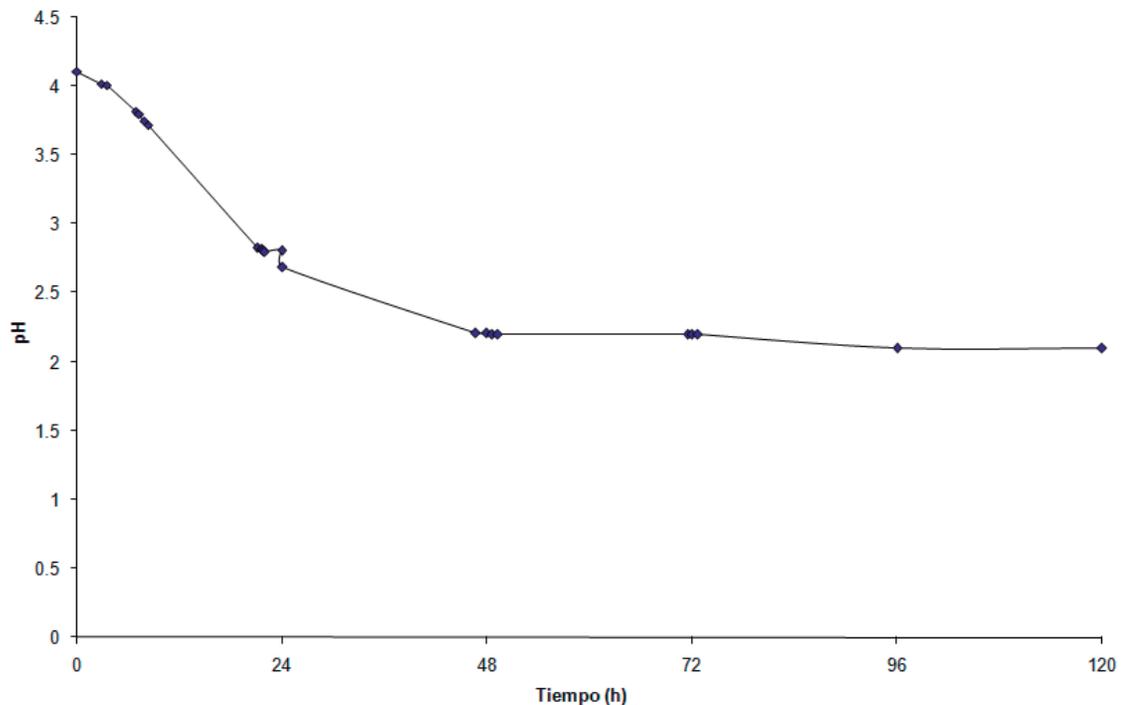
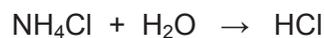


Figura 4.19. Comportamiento de pH. Fermentación 1.

En la Figura 4.19 se observa, que el pH disminuye a medida que avanza la fermentación, hasta que se estabiliza alrededor de un valor de 2.1, ésta disminución se debe a que se liberan iones y los microorganismos excretan ácidos, por lo que el medio se acidifica. La reacción que se registra en el medio es la siguiente:



Teniendo que la velocidad específica de crecimiento del microorganismo para esta fermentación fue de $\mu=0.0384 \text{ h}^{-1}$, lo que indica que el crecimiento del microorganismo fue lento.

4.3.2 FERMENTACIÓN 2

En la fermentación 2, se pudieron apreciar claramente las fases de crecimiento, de acuerdo a la Figura 4.20.

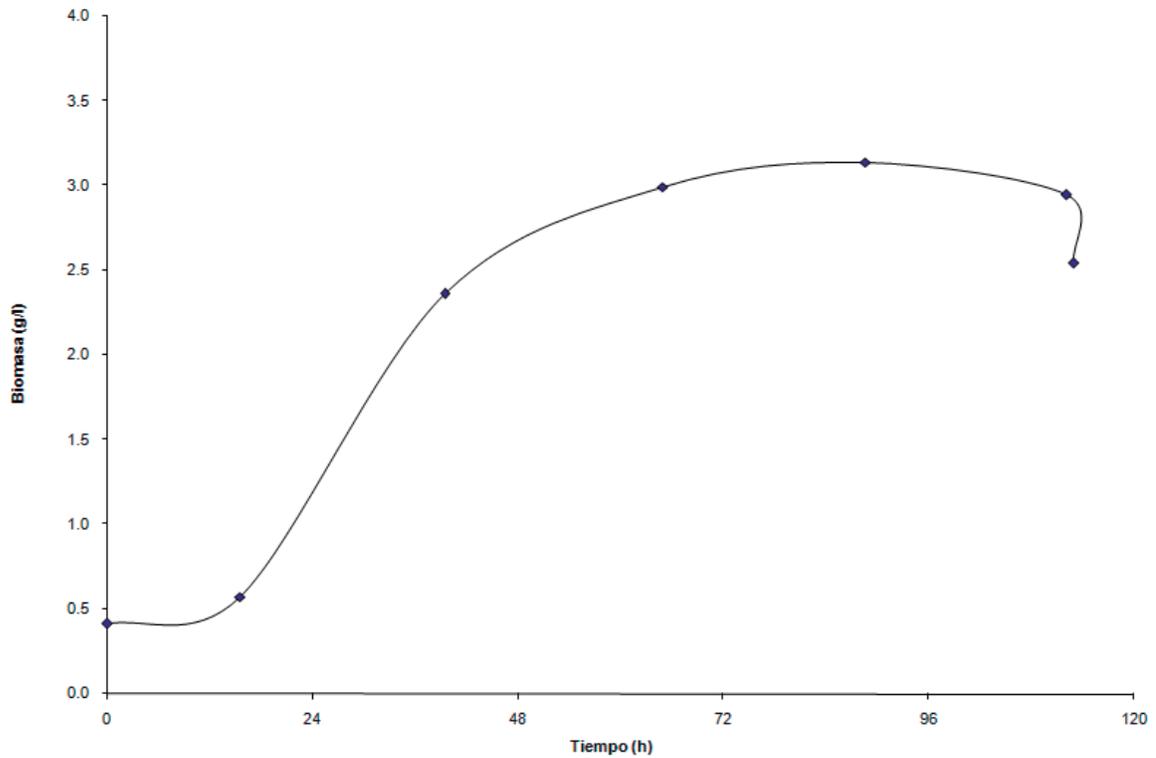


Figura 4.20. Cinética de crecimiento. Fermentación 2.

En la Figura 4.20 se observa la fase de crecimiento lag de las 0 a las 15.5 horas, aproximadamente, después se observa la fase de crecimiento exponencial de las 15.5 horas a las 39.5 horas, posteriormente la fase de crecimiento

estacionaria y finalmente una aparente fase de muerte del microorganismo. Presentando un valor de biomasa máximo de 3.1 g/l.

La velocidad específica de crecimiento del microorganismo fue $\mu=0.0455h^{-1}$, lo que indica una mayor velocidad de crecimiento a diferencia de la cinética de la fermentación 1, esto es menor a 0.0849 g/l reportado por (Shukla y col., 2005) para medios con fuentes de carbono simples (Dextrosa), debido a que la composición del medio de cultivo no es la misma.

Se muestra también la cinética de comportamiento del pH para la fermentación 2, Figura 4.21.

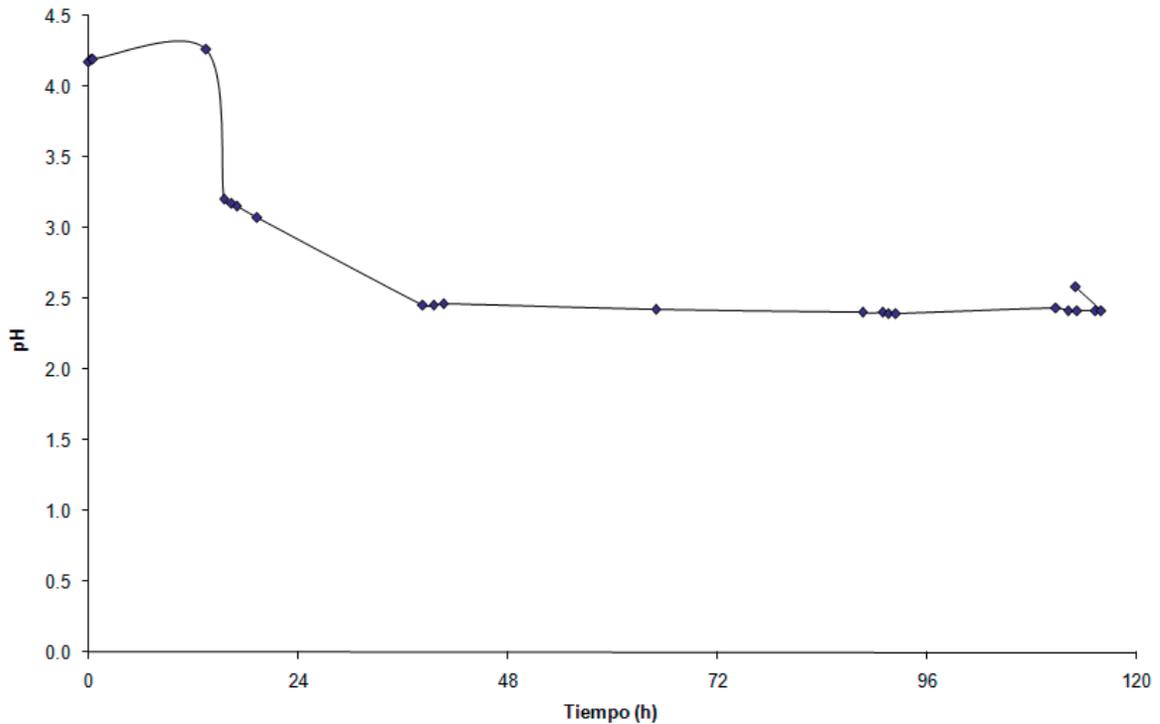


Figura 4.21. Comportamiento de pH. Fermentación 2.

En la Figura 4.22 se muestra el resultado de la observación del frotis al microscopio en campo claro, que se realizó a la muestra de esta fermentación, se

puede observar el microorganismo y sus hifas. En la Figura 4.22 a, se muestra un pellet y en la Figura 4.22 b, el micelio ramificado, apreciándose un desarrollo adecuado del hongo.

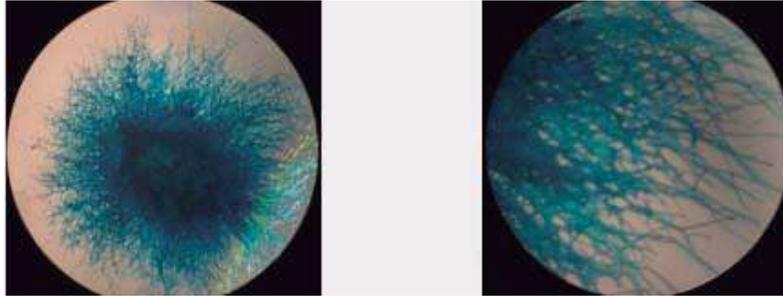


Figura 4.22. a. Pellets.

b. Micelio ramificado.

Vista del frotis al microscopio. Fermentación 2.

4.3.3 FERMENTACIÓN 3

En el desarrollo de la fermentación 3, se tuvieron algunas inconsistencias en la operación del reactor, lo que generó que el microorganismo se encontrara bajo un gran estrés que impidió el crecimiento del mismo y provocando la nula producción de los metabolitos secundarios. El microorganismo tomó una coloración blanca, a diferencia de las otras fermentaciones en las que la coloración fue rojo tenue, resultado típico de acuerdo a la composición del medio de cultivo y a las condiciones de operación, cuando se emplea este microorganismo.

La velocidad específica de crecimiento microbiano de la fermentación 3 fue de $\mu = 0.0039 \text{ h}^{-1}$, lo que muestra que prácticamente el microorganismo no creció, Figura 4.23, manteniéndose en una aparente fase lag durante el desarrollo de la fermentación, lo que se atribuye al estrés hidrodinámico al que estuvo sometido el microorganismo, por los cambios durante la operación del equipo. Observándose también que el pH disminuyó lentamente durante la fermentación, Figura 4.24.

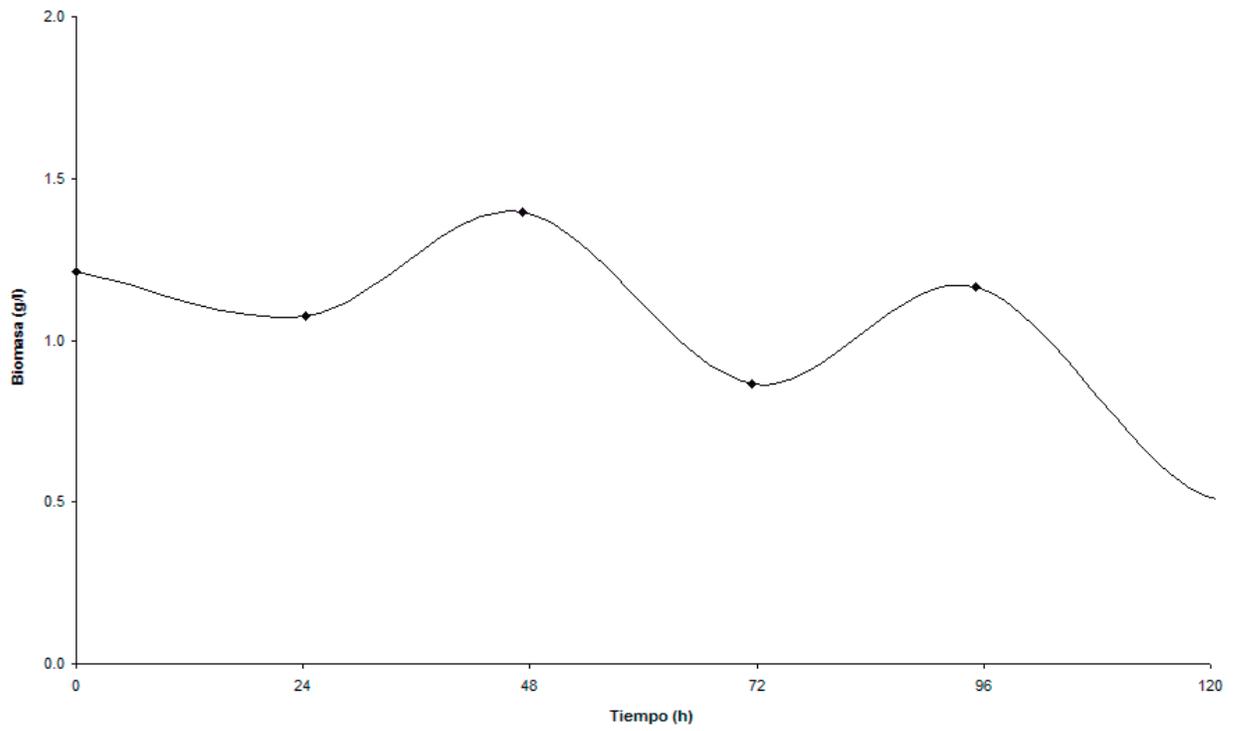


Figura 4.23. Cinética de crecimiento. Fermentación 3.

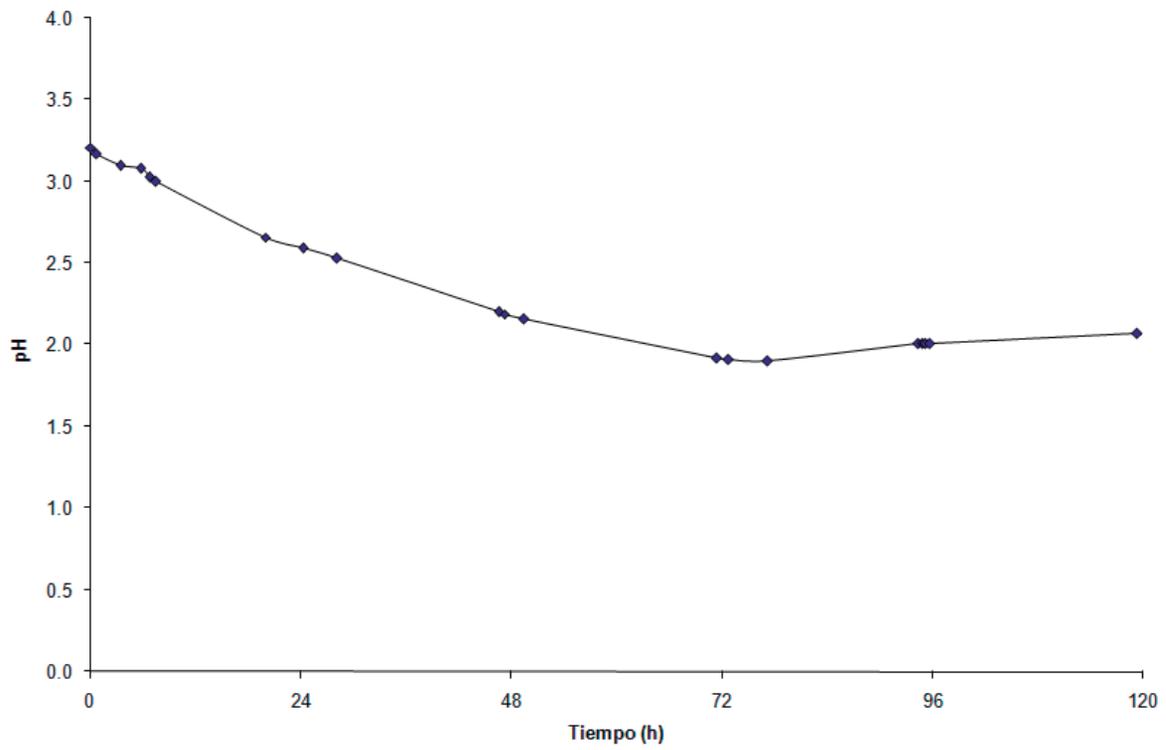


Figura 4.24. Comportamiento pH. Fermentación 3.

Otra forma en que se manifiesto el estrés bajo el que estuvo el hongo, se observa en el microscopio al hacer un frotis con una muestra de esta fermentación.

El estrés bajo el que estuvo sometido el hongo, se observa en el microscopio al hacer un frotis a una muestra de ésta fermentación, Figura 4.25. Se puede hacer una comparación con las imágenes que se presentan en la fermentación 2, donde el hongo se desarrollo adecuadamente en contraste con la de ésta última, teniendo la presencia de macro esporas, que es una forma que toma el microorganismo como defensa a las condiciones en las cuales se encuentra, observándose una lisis celular, que puede atribuirse en parte al tipo de propela del reactor.

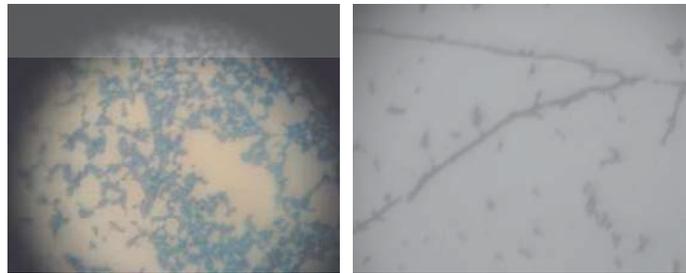


Figura 4.25. Frotis. Fermentación 3.

Cabe mencionar que no hay reportes en la literatura que empleen el fermentador Ace Glass, para fermentaciones aerobias.

4.4. DETECCIÓN DE GIBERELINAS

Del análisis por cromatografía en capa fina, se observó la presencia de metabolitos secundarios (giberelinas). En la Figura 4.26 se muestran la placa de cromatografía en capa fina bajo la luz ultravioleta, en donde se observa la presencia de la coloración azul que corresponde al GA_3 (Cavell y col., 1967), una de las principales giberelinas producidas por este microorganismo.

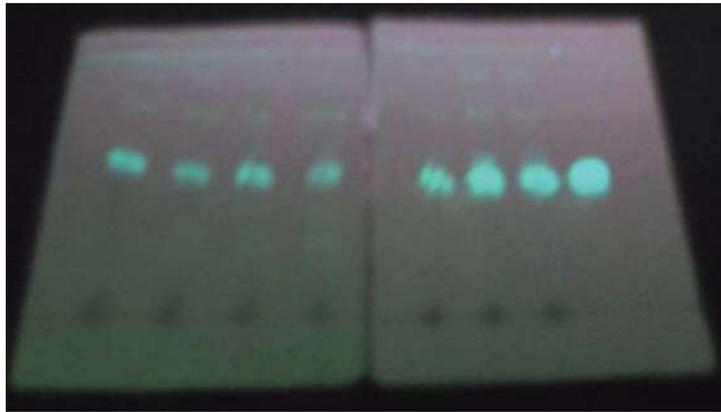


Figura 4.26. Identificación de giberelinas. Cromatografía en capa fina.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Del desarrollo del presente trabajo se concluye que:

El acondicionamiento del sistema de fermentación, reactor de tanque agitado de 7 litros Ace Glass, instalado en el Laboratorio de Electroquímica e Investigación Edificio “E” de la Facultad de Ingeniería Química, fue exitoso, debido a que se instaló y se puso en operación, verificando que es posible adaptar un equipo para poder llevar a cabo fermentaciones aerobias. Teniendo un equipo más económico que un sistema de fermentación adquirido de fábrica. Finalmente se cumplió el objetivo de que los alumnos de la clase de biotecnología puedan contar con una opción para realizar prácticas y reforzar los conocimientos teóricos, comprobándose la hipótesis planteada.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

6.1 RECOMENDACIONES

Para optimizar el funcionamiento del reactor se recomienda lo siguiente:

- La modificación del motor del agitador ya que al funcionar con aire y depender de la operación de un compresor es difícil mantener estables las revoluciones por minuto (velocidad de agitación).
- Utilizar un tipo de propela diferente (por ejemplo: de tipo Rushton).
- Realizar fermentaciones con microorganismos diferentes al que se utilizó en este trabajo.
- Estudiar fermentaciones cambiando algunas condiciones como; las concentraciones del medio de cultivo o controlando parámetros diferentes a los estudiados en el presente trabajo; como el pH.

6.2 SUGERENCIAS

Para trabajos futuros se sugiere lo siguiente:

- Al trabajar con microorganismos como el que se estudió en este trabajo, se realicen otro tipo de análisis para la cuantificación de los compuestos producidos, como podría ser la cromatografía de líquidos (HPLC), entre otros.
- Implementar prácticas para la clase de biotecnología como pueden ser: Producción de ácido acético, obtención de etanol, entre otras.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, J. E. y Ollis D. F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2da. Edition Ed. Mc-GrawHill International Editions. Chemical Engineering Series.
- Bolívar, F. G. (2004). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Colegio Nacional.
- Brückner, B. y Blechschmidt D. (1991). The Gibberellin Fermentation. Crit. Rev. Biotechnol.
- Cavell, B. D., MacMillan J., Pryce R. J. and Sheppard A. C. (1967). Plant hormones V. Thin-layer and gas-liquid chromatography of the gibberellins. *Phytochemistry*.
- Chávez, P. Ma. Del C. (2005). Producción de ácido giberélico en un biorreactor air-lift. Tesis de Doctorado en ciencias en Ing. Química. Instituto Tecnológico de Celaya.
- Giordano, W. y Domenech C. E. (1999). Aerations affects acetate destination in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiology letters.
- González, O. O. (2000). Extracción de metabolitos secundarios: adecuación de un equipo de extracción sólido-líquido. Instituto Tecnológico de Morelia.
- Lee, J. M. (1991). Biochemical Engineering. Ed. Prentice Hall.
- Negrete, R. M. L. X, (2002). Producción de ácido giberélico (GA₃) en bioreactor de tanque agitado con *Gibberella fujikuroi* empleando aceite de maíz como fuente de carbono”. Tesis de Maestría en ciencias en Ing. Química. I. T. C.
- Prentis, S. (2000). Biotecnología. Salvat Editores.
- Quintero, R. R. (1981). Ingeniería bioquímica, Teoría y aplicaciones. Ed. Alambra. México.
- Schügerl, K. (1982). New Bioreactors for aerobic processes. International Chemical Engineering. Vol. 22. No. 4.

- Tudzynski, B. (1999). Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. Appl. Microbiol. Biotechnol.
- Vogel, C. H., Todaro C. L. y col. (1997). Handbook of Fermentation. Noyes Publications.

MANUAL DE MANTENIMIENTO Y LIMPIEZA DEL REACTOR DE TANQUE
AGITADO ACE GLASS



Figura A1. Reactor de tanque agitado marca Ace Glass.

En este manual se dan instrucciones que serán de gran ayuda para el momento en que se necesita desarmarlo, ya sea para su limpieza o su descarga después de haber terminado una fermentación.

Cabe mencionar que al ser un reactor de vidrio hay que manejarlo con extremo cuidado para evitar lesiones tanto en el aparato como en la persona que lo está operando.

DESENSAMBLE

PASO 1.

Aflojar y retirar los 4 tornillos de la placa negra que sirve de base al motor de aire, ubicada en la parte superior de la estructura metálica (Figura A2).



Figura A2. Placa base del motor de aire.
de aire.

PASO 2.

Abrir el seguro de la abrazadera que une la tapa con el tanque del reactor, enseguida retire la abrazadera (Figura A3).



Figura A3. Tapa del reactor.

Paso 3.

Retirar cuidadosamente la tapa del reactor unida al motor y la propela. Tener precaución con la tapa del reactor al acomodarlo sobre alguna superficie (Figura A4).



Figura A4. Tapa del reactor unida al motor y la propela

En este paso se recomienda que trabajen dos personas para sacar el motor y propela de la estructura ya que al mismo tiempo debe sostenerse la tapa de vidrio del reactor y el peso del motor puede ganar y provocar un accidente.

Paso 4.

Aflojar las palomas de los tornillos de la abrazadera del cuello del reactor. Enseguida quitar los tornillos de los postes de soporte de la abrazadera (Figuras A5 – A7).



Figura A5. Tanque del reactor.

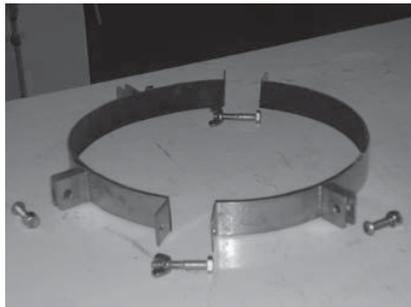


Figura A6. Abrazadera de seguridad.



Figura A7. Postes de soporte de la abrazadera de seguridad.

Paso 5.

Retirar el tanque de la estructura. En este punto se aconseja ya tener un lugar preparado para colocar el tanque. Debe colocarse boca abajo con el fin de que no se ruede o resbale dañándose (Figura A8).



Figura A8. Tanque del reactor.

Paso 6.

Retirar las boquillas de la de alimentación y salida de la chaqueta para su limpieza (Figura A9).

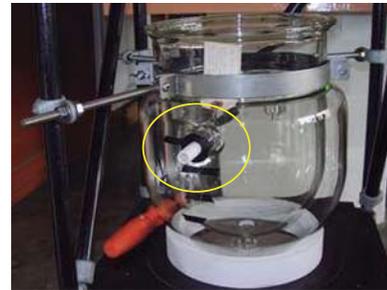


Figura A9. Boquillas de la chaqueta.

Paso 7.

Desconectar la propela siguiendo la secuencia que se indica abajo (Figura A10).



Figura A10. Propela

- a. Desenroscar la pieza superior esto permitirá separar las cuatro piezas principales (Figura A11).



Figura A11. Principales partes de la propela.

- b. Extraer el poste que se encuentra en la pieza rosca macho y el tornillo de plástico que se encuentra en la base de la misma. Esto permitirá retirarla del poste y poder sacar todas las piezas (Figura A12).

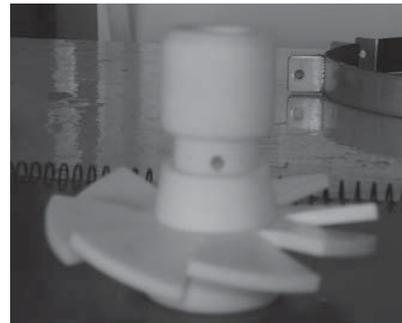


Figura A12. Propela fuera del eje.

- c. Retirar la tapa del reactor del eje de la propela (Figura A13).



- d. Quite del eje de la propela la unión de cristal de la tapa y el eje.

Figura A13. Unión de la tapa y el eje.

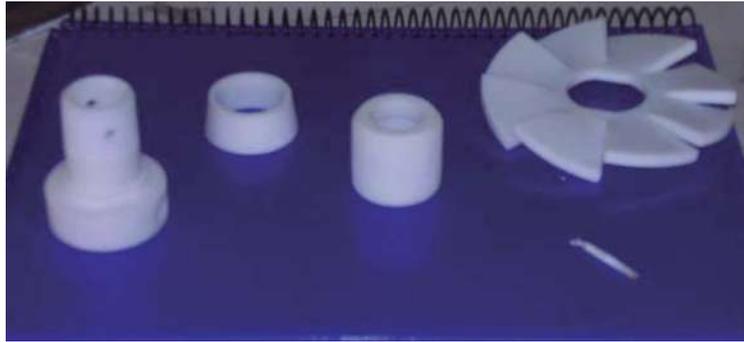


Figura A14. Accesorios de la propela.

HERRAMIENTAS UTILIZADAS.

Para poder realizar todas las acciones que atrás se mencionan se utilizaron las herramientas que se enlistan a continuación.

- Llave inglesa # 12.
- Llave inglesa # 14.
- Desarmador plano $\frac{1}{4}$ in.
- Desarmador estrella T25.

RECOMENDACIONES.

- Si el equipo es desarmado después de haber sido utilizado en alguna fermentación, se debe usar el equipo de protección adecuado al hongo utilizado.
- Es importante considerar los tiempos a utilizar cuando se tenga que desarmar el reactor para trabajar con la mayor tranquilidad posible evitando así la probabilidad de cometer errores y dañar el equipo.

- El reactor debe ser armado completamente limpio y seco para evitar que las piezas de vidrio se resbalen de las manos.
- Antes de comenzar a desarmar el reactor retire todos los instrumentos con el cuidado requerido por cada uno de ellos.