

03072

9
2y

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
U.A.C.P.Y.P. - C.C.H.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIOS PARA EL ESCALAMIENTO DE UN PROCESO POR LOTE DE NIVEL
DE LABORATORIO A PLANTA PILOTO PARA LA PRODUCCION DE
Bacillus thuringiensis

TESIS QUE PRESENTA:

ELIAS RAZO FLORES
INGENIERO QUIMICO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA D.F.
MEXICO
1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

PAGINA

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	3
3.	ANTECEDENTES	
3.1	ASPECTOS GENERALES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
3.2	CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
3.3	TOXINAS PRODUCIDAS POR <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
3.4	MODO DE ACCION DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
3.5	PRODUCCION DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3.6	TRANSFERENCIA DE MASA EN REACTORES BIOLOGICOS	18
3.6.1	AGITACION Y AIREACION	18
3.7	ESCALAMIENTO DE PROCESOS	29
3.7.1	METODOS DE ESCALAMIENTO	31
3.7.1.1	METODO FUNDAMENTAL	32
3.7.1.2	METODO SEMIFUNDAMENTAL	33
3.7.1.3	ANALISIS DIMENSIONAL	33
3.7.1.4	PRUEBA Y ERROR	34
3.7.1.5	ESCALAMIENTO DESCENDENTE	34
3.7.1.6	METODO EMPIRICO	34
3.7.2	EJEMPLOS DE ESCALAMIENTO DE PROCESOS FERMENTATIVOS	41
4.	JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	
4.1	JUSTIFICACION	45
4.2	OBJETIVO GENERAL	45
4.3	OBJETIVOS PARTICULARES	45
5.	MATERIALES Y METODOS	
5.1	MICROORGANISMO	47
5.2	CONSERVACION DEL MICROORGANISMO	47
5.3	MEDIOS DE CULTIVO	47

5.3.1 MEDIO DE PROPAGACION	47
5.3.2 MEDIO DE FERMENTACION	47
5.3.3 MEDIO M. P.	47
5.3.4 MEDIO PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD	47
5.4 PREPARACION DE LOS MEDIOS	48
5.5 DESARROLLO DE INOCULO Y CULTIVO POR LOTE EN LABORATORIO	48
5.6 DESARROLLO DE INOCULO Y CULTIVO POR LOTE EN PLANTA PILOTO	48
5.7 FERMENTADORES	49
5.8 CONTROL DEL PROCESO E INSTRUMENTACION EN EL RB 14	53
5.9 CONTROL DEL PROCESO E INSTRUMENTACION EN EL RC 30 Y RN 1000	53
5.10 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	53
5.11 DETERMINACION DEL RENDIMIENTO EN BASE A SUSTRATO (Y X/S)	54
5.12 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO (OTR) Y DEL COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO (K _L a)	54
5.13 DETERMINACION DE K _L a POR EL METODO DE SULFITO ALIMENTADO	55
6. RESULTADOS Y DISCUSION	
6.1 CARACTERIZACION BIOLOGICA DEL FERMENTADOR RB 14 Y ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE ESCALAMIENTO ...	56
6.2 CARACTERIZACION QUIMICA DEL FERMENTADOR RB 14	66
6.3 CARACTERIZACION DEL FERMENTADOR RB 14 POR EL METODO DE ALIMENTACION DE SULFITO DE SODIO	66
6.4 ADECUACION Y ARRANQUE DEL FERMENTADOR RN 1000	
6.4.1 DISEÑO Y CONSTRUCCION DEL SISTEMA DE AGITACION	70
6.4.2 ANILLO DIFUSOR	73
6.5 CARACTERIZACION DEL FERMENTADOR RN 1000 Y ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACION PARA EL ESCALAMIENTO ...	74
6.6 ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE FERMENTACION DE <i>Bacillus luringiensis</i> EN EL FERMENTADOR RN 1000	78

6.7 COMPARACION DE OTR EN LOS SISTEMAS BIOLOGICO Y QUIMICO	86
6.8 BIOCENSAYOS PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD DEL BIOINSECTICIDA PRODUCIDO	88
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
7.1 CONCLUSIONES	90
7.2 RECOMENDACIONES	91
8. BIBLIOGRAFIA	93
APENDICE A	107

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
3.1 TRES PASOS DINAMICOS EN UNA FERMENTACION	20
3.2 TEORIA DE LAS TRES PELICULAS DE LA TRANSFERENCIA DE MASA GAS-LIQUIDO	21
3.3 ESCALAMIENTO DESCENDENTE	35
5.1 CARACTERISTICAS GEOMETRICAS DEL FERMENTADOR RB 14	50
5.2 FERMENTADOR RN 1000	51
5.3 IMPULSOR Y SUS CARACTERISTICAS GEOMETRICAS RN 1000	52
6.1 CARACTERIZACION BIOLOGICA DEL FERMENTADOR RB 14 A 1 VVM ...	58
6.2 PERFILES DE OXIGENO DISUELTO FERMENTADOR RB 14 A 1 VVM ...	59
6.3 X_E vs $K_L a$ FERMENTADOR RB 14	62
6.4 CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EN EL FERMENTADOR RB 14 A 1 VVM Y 900 RPM	65
6.5 $K_L a$ EN FUNCION DE AGITACION EN EL FERMENTADOR RB 14	69
6.6 $K_L a$ EN FUNCION DE VELOCIDAD DE AGITACION EN EL FERMENTADOR RN 1000 Y RB 14	75
6.7 OTR EN FUNCION DE VELOCIDAD DE AGITACION EN EL FERMENTADOR RN 1000 Y RB 14	75
6.8 RELACION ENTRE EL $K_L a$ EXPERIMENTAL Y EL $K_L a$ TEORICO EN EL FERMENTADOR RN 1000	77

FIGURA**PAGINA**

6.9 CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EN EL FERMENTADOR RN 1000 A 0.4 VVM Y 35CRPM	81
6.10 PRODUCTIVIDAD EN FUNCION DE OTR	85

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
2.1 PRODUCTOS COMERCIALES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
3.1 COMPARACION DE PROCESOS DE PRODUCCION DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	19
3.2 FACTORES QUE SON CONSIDERADOS AL ESCALAR UN PROCESO DE FERMENTACION	30
3.3 CRITERIOS DE ESCALAMIENTO EMPLEADOS EN LA INDUSTRIA DE FERMENTACION EUROPEA	38
3.4 DIFERENTES CRITERIOS DE ESCALAMIENTO Y SUS CONSECUENCIAS	40
3.5 EJEMPLOS DE ESCALAMIENTO DE PROCESOS FERMENTATIVOS	44
6.1 DATOS OBTENIDOS DE LAS FERMENTACIONES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EN EL FERMENTADOR RB 14 A VELOCIDAD DE AIREACION CONSTANTE (1 VVM) Y DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACION	57
6.2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACION PARA k_{10} Y OTR DEL FERMENTADOR RB 14 EMPLEANDO EL METODO DEL BALANCE CON SULFITO DE SODIO	67
6.3 CARACTERISTICAS GEOMETRICAS DE LA FLECHA E IMPULSORES DEL FERMENTADOR RN 1000	72
6.4 RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS FERMENTACIONES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EN EL FERMENTADOR RN 1000	80
6.5 RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> A LAS CONDICIONES DE ESCALAMIENTO	83

6.6	COMPARACION DE OTR EN LOS SISTEMAS BIOLOGICO Y QUIMICO	87
6.7	RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS EFECTUADOS CON EL BIOINSECTICIDA PRODUCIDO EN EL ESCALAMIENTO	89

1. RESUMEN

Se estudio si el criterio de velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) constante, era factible para el escalamiento del proceso de producción de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-73), de nivel de laboratorio (14 l) a nivel planta piloto (1100 l).

En primer término se efectuó la caracterización del fermentador de 14 l (RB 14), en relación a K_La y OTR, empleando el método del balance con un sistema químico y con un sistema biológico. Esto con el fin de determinar las condiciones de escalamiento y los parametros cinéticos del proceso, los resultados fueron: $OTR_s = 3.387$ g/l-h, $OTR_b = 1.7$ g/l-h, $\mu = 0.7805$ h⁻¹, $Y_{x/s} = 0.355$ g/g glucosa y una productividad de 1.88×10^{11} esporas/l-h.

En segundo término se realizó la adecuación, arranque y caracterización para K_La y OTR del fermentador de planta piloto RN 1000 (1100 l), empleando el método del balance con un sistema químico, con el propósito de determinar las condiciones para alcanzar el OTR que se había fijado en base a los experimentos en 14 l. Estas condiciones fueron: 350 RPM ($D_i = 26.7$ cm) y 0.4 VVM.

Posteriormente se efectuó el escalamiento del proceso al fermentador RN 1000. Los resultados mostraron que al mismo OTR la μ es mayor en el RB 14 mientras que P_v es mayor en el RN 1000. Puesto que la hidrólisis de las materias primas fué realizada bajo diferentes condiciones (sin agitación mecánica vs agitación mecánica), la diferencia en productividad podría deberse a la

disponibilidad de nutrientes en ambos casos.

Se comprobó que para ambos fermentadores con el mismo medio de cultivo y microorganismo, a un valor de OTRs le corresponde el mismo valor de OTRs. Así mismo, en base a los resultados obtenidos en el RB 14 se estableció un modelo que predice que P_v es constante a partir de un valor de $OTR_s = 2.3 \text{ g/l-h}$.

La productividad alcanzada (2.207×10^{11} Esporas/l-h) es 63.5 % superior al valor más alto reportado en la literatura (PEARSON Y WARD, 1988), y la actividad del bioinsecticida es comparable al estandar.

2. INTRODUCCION

La lucha química contra los insectos resulta cada vez más complicada y en ocasiones hasta decepcionante, principalmente a causa de los fenómenos de resistencia a los insecticidas que éstos han desarrollado. En efecto, en 1948, 14 especies de insectos nocivos eran resistentes a un insecticida, en 1969 eran 229 y en 1984, se contaba con más de 447 (MOUCHES, 1980). La comprensión de este fenómeno, de graves consecuencias sobre los costos de producción agrícola y sobre la salud humana -los insecticidas químicos no son biodegradables, por lo tanto, se acumulan en la naturaleza causando problemas de contaminación ambiental-, ha llevado a la implementación del control biológico.

Las posibilidades de éxito del control biológico son alentadoras, a tal punto que en los países desarrollados ya se fabrican productos comerciales para proteger ciertos cultivos agrícolas. En la Unión Soviética y China se protegieron en 1989 alrededor de 19 millones y 8 millones de hectáreas de cultivos agrícolas, respectivamente (RIMMINGTON, 1989). En 1986 el mercado de los agentes de control biológico representó el 1 % del mercado total de insecticidas que ascendió a 10×10^9 dólares, y en ese año se estimó que aumentaría en un 10 % o más al final de la década (KHACHATOURIANS, 1980).

La FAO en 1978 calculó que las plagas y enfermedades de plantas dañaron el 22.6 % de la producción agrícola mexicana, lo cual representó pérdidas de alrededor de 60,000 millones de pesos (NIEMBRO, 1982).

Los agentes microbianos de control biológico son organismos que se encuentran en la naturaleza e incluyen: virus, bacterias, protozoarios, nemátodos y hongos. El más importante desde el punto de vista comercial es el género *Bacillus*, del cual sólo cuatro especies han sido estudiadas como insecticidas: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus lentimorbus* y *Bacillus sphaericus*. De éstos, *Bacillus thuringiensis* es el más explotado industrialmente, ya que los demás presentan problemas técnicos para producirlos a gran escala. En la tabla 2.1 se presentan algunos de los bioinsecticidas producidos en base a *B. thuringiensis* a nivel industrial.

Muchas publicaciones han cubierto diferentes aspectos relacionados con los insecticidas bacterianos tales como: genética, metabolismo, toxinas, etc.. Sin embargo, muy poco se ha enfocado a los procesos de fermentación y desarrollo de tecnología (ERTOLA, 1987; ROWE Y MARGARITIS, 1987).

En base a lo anteriormente expuesto, en el CINVESTAV-IPN se implementó un proyecto de investigación para el desarrollo de una tecnología propia para la producción de bioinsecticidas a partir de *Bacillus thuringiensis*. El proyecto esta auspiciado por el International Development and Research Center (IDRC) del Canada y las instituciones participantes son: CINVESTAV-IPN, Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria (MIDINRA) de Nicaragua y University of Western Ontario (UWO) del Canada.

Se han generado a la fecha dos bioinsecticidas con actividades biológicas comparables a los insecticidas comerciales (DE URQUIJO, 1987), utilizando materias primas de bajo costo y

TABLA 2.1: PRODUCTOS COMERCIALES DE *Bacillus thuringiensis*.

PRODUCTO	PAIS	VARIEDAD	COMPANIA
BACTOSPEINE	FRANCIA	thuringiensis	BIOCHEM PROD.
LEPTOX	FRANCIA	thuringiensis	BIOCHEM PROD.
BUG TIME	FRANCIA	kurstaki	BIOCHEM PROD.
THURICIDE	E. U. A.	kurstaki	SANDOZ INC.
DIPEL	E. U. A.	kurstaki	ABBOTT LABS.
ENTOBACTERINE 3	U. R. S. S.	galleriae	
DENDROBACILLINE	U. R. S. S.	dendrolimus	
TEXOBACTERIN	U. R. S. S.	insectus	
BIP	U. R. S. S.	caucasicus	
BITOXOBACILLINE	U. R. S. S.	thuringiensis	
BATHURIN	C. R. S. S.	thuringiensis	
THURINGIN	RUMANIA	desconocida	
BAKTUKAL	YUGOSLAVIA	thuringiensis	SERUM ZAWOD KAL
SKEETAL	U. K.	israelensis	TATE & LYLE CO.
TEKNAR	E. U. A.	israelensis	SANDOZ INC.
VECTOBAC	E. U. A.	israelensis	ABBOTT LABS.
M-1	E. U. A.	sandiego	MYCOGEN CO.

alta calidad, disponibles en México. Los bioinsecticidas producidos han sido de dos variedades:

A) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (HD 73), que tiene actividad contra las plagas agrícolas *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* y *Manduca sexta*. Estas plagas atacan principalmente los cultivos de maíz, algodón, sorgo, papa, jitomate, caña de azúcar, frijol, tabaco y otros cultivos MÁS (MC GREGOR Y GUTIERREZ, 1963).

B) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H- 14) para el control de dípteros de importancia médica, como son los vectores *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* que son los transmisores de la encefalitis equina, paludismo y dengue respectivamente.

La producción de los bioinsecticidas se ha llevado a cabo a nivel laboratorio en fermentadores de 14 l, y los productos obtenidos han reportado actividad biológica comparable a los bioinsecticidas existentes en el mercado (DE URQUIJO, 1967). Lo cual apoya la necesidad de establecer las condiciones para llevar el proceso a escala de planta piloto en el fermentador RN 1000 de 1.1 m³ (volumen nominal) instalado en el mismo CINVESTAV-IPN.

3. ANTECEDENTES

3.1 ASPECTOS GENERALES DE *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es el microorganismo entomopatógeno de mayor producción y distribución en el mundo, se emplea como insecticida de alta especificidad. Hoy en día se utilizan aproximadamente 2.3 millones de kg de bioinsecticidas de *B. thuringiensis* anualmente, para el control de plagas agrícolas y forestales principalmente. En México se importan cerca de 100 toneladas/año de los bioinsecticidas Dipel® producido por Abbot Lab. y Thuricide® producido por Sandoz Inc. (SANIDAD VEGETAL, SARH, 1990).

Las ventajas que presenta *B. thuringiensis* con respecto a los insecticidas químicos son las siguientes (ROWE Y MARGARITIS, 1987):

- A) Presenta alta especificidad siendo inocuo al hombre, animales domésticos, flora y fauna silvestre.
- B) Es el único insecticida aprobado por la FDA para ser aplicado incluso hasta el mismo día de la cosecha.
- C) Presenta una vida de anaquel económica y prolongada sin perder su actividad biológica a temperatura ambiente.
- D) Adaptable a muchos tipos de formulaciones, lo cual incrementa su potencia.
- E) Existe la posibilidad de reducir los costos de producción a través de mejoras a la tecnología de fermentación.

F) Alta probabilidad de aumentar la eficacia de *B. thuringiensis* por medio de la selección de nuevas cepas o cepas manipuladas por ingeniería genética que presenten un espectro insecticida más amplio o una actividad específica más alta.

De la misma manera, *B. thuringiensis* tiene algunas desventajas con respecto a los insecticidas químicos (ROWE Y MARGARITIS, 1987):

- A) Bajo espectro insecticida.
- B) Carencia de protección de patente sobre las nuevas cepas silvestres.
- C) Requiere de un tiempo de aplicación adecuado debido a su menor efecto con respecto a los químicos.
- D) Su efectividad depende de que los insectos lo ingieran.
- E) Alto costo.

3.2 CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE *Bacillus thuringiensis*.

El microorganismo es un miembro del grupo I del género *Bacillus*, que además incluye a *B. subtilis*, *B. licheniformes*, *B. cereus* y *B. anthracis*. Está muy relacionado a *B. cereus* y solo se distingue de él por la presencia de un cuerpo parasporal y por sus antígenos flagelares (BULLA et al, 1980).

Las células vegetativas son Gram positivas, esporógenas,

entomopatógenas facultativas, con un tamaño promedio de 2 a 5 μm por 1 μm y tienen flagelos peritricos. Se reproducen por fisión binaria, ocurriendo frecuentemente en cadenas. Además en muchas variedades durante la esporulación es formado un cristal proteínico bipiramidal, éste se localiza fuera de la membrana parasporal y es liberado al término de la esporogénesis por ruptura de la membrana plasmática. Este cristal parasporal es tóxico para larvas de insectos (FAST, 1961). Los genes que codifican para esta proteína parasporal generalmente se encuentran en plásmidos, aunque se han dado casos de localización cromosomal (ARONSON et al, 1969).

La clasificación de *B. thuringiensis* en variedades se basa en los antígenos flagelares de las células vegetativas (antígenos H^o o serotipos), complementado principalmente con pruebas bioquímicas. De esta manera se han reportado un total de 33 variedades hasta 1987.

Alternativamente en el trabajo de BROUSSEAU Y MASSON (1968), aparece una clasificación más útil y aplicativa. Esta clasificación esta basada en el patotipo que presentan las variedades de *B. thuringiensis*:

- A) Específico para dípteros.
- B) Específico para lepidópteros.
- C) Específico para coleópteros.
- D) Específico para lepidópteros y dípteros.
- E) Actividad insecticida desconocida.

3.3 TOXINAS PRODUCIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.

Han sido descritas siete diferentes toxinas en cepas de *B. thuringiensis* (LUTHY Y EBERSOLD, 1981):

- A) Fosfolipasa C (α -Exotoxina)
- B) Exotoxina termoestable (β -Exotoxina)
- C) Enzima no identificada que puede no ser tóxica (γ -Exotoxina).
- D) Protoxina del cristal parasporal (δ -Endotoxina).
- E) Toxina lábil.
- F) Toxina soluble en agua.
- G) Exotoxina "Factor Ratón".

De estas toxinas, la β -Exotoxina y la δ -Endotoxina son las más estudiadas por sus propiedades tóxicas contra larvas de insectos.

La β -Exotoxina, también conocida como "Factor Mosca", es una toxina termoestable altamente tóxica a moscas y algunos insectos. Es un inhibidor potente de la RNA polimerasa de bacterias y células animales y en eritrocitos humanos ocasiona mutaciones cromosomales. Debido a sus propiedades teratogénicas y mutagénicas su uso está prohibido en Norteamérica y Europa. Solo es producido y usado en la U.R.S.S. (ROWE Y MARGARITIS, 1987; RIMMINGTON, 1989). Cabe aclarar que las cepas empleadas en el CINVESTAV-IPN no producen β -Exotoxina.

La δ -Endotoxina es el mayor componente del cristal

parasporal formado durante la esporulación. La función del cristal en la célula y su origen bioquímico exacto son desconocidos. En general, un cristal y una pequeña inclusión oval son formados en cada célula y la inclusión oval tiene mayor toxicidad específica que el cristal. El cristal parasporal está compuesto de subunidades glicoproteicas teniendo un peso molecular de 134 000 daltons. La masa de una espора madura es de al menos 15 % de la masa de la célula vegetativa previa y el cristal es de 12.5 a 17 % de la misma.

Por lo que respecta a la composición de aminoácidos de la parte proteica del cristal, destaca su alto contenido de ácido aspártico, ácido glutámico y arginina (GULLA et al. 1960).

3.4 MODO DE ACCION DE *Bacillus thuringiensis*.

La toxicidad de la δ -endotoxina hacia un insecto específico depende del tipo de cristal y variedad de *B. thuringiensis*. Se especula que hay dos mecanismos que pueden explicar este fenómeno. En uno de ellos se argumenta que diferentes variedades producen toxinas diferentes y/o que la misma protoxina es hidrolizada a fragmentos tóxicos únicos por las diversas especies de insectos (ROWE Y MARGARITIS, 1967).

Básicamente, la acción entomopatógena de la δ -Endotoxina en lepidópteros, se presenta después de ser ingerida por la larva susceptible. Esta protoxina es hidrolizada por proteasas digestivas y el ambiente alcalino del intestino medio de las

larvas. Al ser hidrolizada la protoxina es desdoblada a fragmentos más pequeños, los cuales son resistentes a proteasas (ARONSON et al. 1966; LECADET Y MARTOURET, 1967). Las subunidades de la protoxina atacan la membrana del intestino medio, causando parálisis vía rompimiento del intestino y escape de los jugos gástricos al hemocele. Estas lesiones pueden ser lo suficientemente severas para matar a la larva o bien, causar cambios que favorezcan el crecimiento y proliferación del microorganismo resultando una septicemia. La combinación de parálisis intestinal, fagodepresión y septicemia ocasionan la muerte de la larva, usualmente en un tiempo de 24 a 96 horas después de la ingestión de los cristales paraesporales y la endospora (COUCH Y ROSS, 1960).

La evolución e intensidad del proceso de septicemia tóxica son extremadamente variables y ambas dependen de la especie de insecto y de la cepa de *B. thuringiensis* involucrada (BURGERJON Y MARTOURET, 1971).

3.5 PRODUCCION DE *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis se ha producido por medio de fermentación semisólida y sumergida.

En la fermentación semisólida en particular se han encontrado inconvenientes COMO SON (DULMAGE Y RHODES, 1971):

- A) Alto porcentaje de sustrato residual.

- B) Rendimientos muy bajos.
- C) La calidad del bioinsecticida es muy heterogénea.
- D) Los factores de fermentación son difíciles de controlar (O_2 , T y pH).
- E) La aplicación en campo del bioinsecticida producido por este medio presenta serios problemas.

Por todo lo anterior se cuestiona su competencia frente a la fermentación sumergida. En 1979, Nutrilite Products Inc. cesó la producción de su producto Biotrol®, el último material comercial que era producido por fermentación semisólida.

En fermentación sumergida se han obtenido altos rendimientos, una calidad homogénea de producto y tiempos de fermentación relativamente cortos.

Con respecto a las condiciones de fermentación, INSELL (1983) reporta un intervalo de temperatura para crecimiento de *B. thuringiensis* de 20 a 42°C. Sin embargo, crecer el microorganismo a temperatura baja resulta en un pobre crecimiento, en tanto que a temperatura alta se tiene una pérdida en la producción de endotoxina. La temperatura óptima de fermentación para la producción del complejo espora-cristal es de 30°C (ROWE Y MARGARITIS, 1987).

SMITH (1982) estudió el efecto del pH sobre la producción de toxina en tres cepas de *B. thuringiensis* H-14, sin encontrar diferencias en el nivel de toxina en las fermentaciones que presentaron un pH final de 5.7 a 8.1. De manera contraria, la cuenta de esporas mostró grandes variaciones dentro del intervalo

probado. KENNEY Y COUCH (1981) encontraron que el pH óptimo para la producción de *B. thuringiensis* es de 7.

La producción de bioinsecticidas requiere el diseño de un medio adecuado para el crecimiento, esporulación y formación de endotoxina. A este respecto es importante conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo usado. La glucosa es la mejor fuente de carbono, aunque otros compuestos pueden ser utilizados, tales como almidón, sacarosa y glicerol. SMITH (1982) utilizó glucosa, sacarosa y glicerol para crecer *B. thuringiensis* var. *israelensis* y mostró que con glucosa se alcanzaron las concentraciones de esporas más altas. De acuerdo a ARCAS (1985), con glucosa como fuente de carbono se obtuvo una cuenta alta de unidades formadoras de colonias (CFU) y niveles altos de δ -endotoxina, para una cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Además es esencial una adecuada fuente de nitrógeno para el crecimiento. La literatura reporta que el amonio es la fuente de nitrógeno más utilizada durante la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, en la fase de esporulación el microorganismo muestra una preferencia por los aminoácidos (GOROV et al. 1984). Los medios comerciales usados han empleado fuentes complejas de nitrógeno tales como: proteína de semilla de maíz, agua de cocimiento de maíz, harina de pescado, semilla de algodón, etc.. Los medios son en ocasiones suplementados con extracto de levadura, peptona o mezclas de estos. DULMAGE (1981) reporta que la omisión de estos suplementos retarda la esporulación y reduce el rendimiento de δ -endotoxina. De la misma manera, GOLDBERG et al (1980) observó un marcado incremento en el crecimiento celular y

rendimiento de esporas cuando adicionó extracto de levadura a su medio complejo.

Con respecto a los requerimientos de minerales, NICKERSON Y BULLA (1974) han enfatizado la importancia de Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} y Zn^{+2} y en algunos casos Cu^{+2} y Fe^{+2} .

Ahora bien, el oxígeno es requerido para el crecimiento. Algunos autores han mencionado que altas velocidades de aireación son esenciales para la formación de espora y toxina (DULMAGE, 1981; ZAMOLA et al. 1981; LUTHY et al. 1982; ARCAS, 1985). De acuerdo con ARCAS (1985) la esporulación está relacionada al coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa), ya que él determinó que el porcentaje de esporulación se incrementa de 70 a 100 %, con una relación espora/cristal de 1, cuando el KLa se aumentó de 38 a $220 h^{-1}$. Por otro lado, ARCAS et al. (1985) observaron que trabajando en un fermentador de laboratorio con un volumen de operación de 4 l, aireación de 0.5 V.V.M. y agitación de 550 R.P.M., con una concentración de glucosa de 8 g/l, el oxígeno disuelto permaneció al 50 % del valor de saturación; pero cuando la concentración de glucosa y el resto de los componentes del medio se incrementaron de 5 a 7 veces, el oxígeno disuelto cayó a 0 %. Los autores mencionan que este comportamiento no tuvo influencia sobre la esporulación o formación de toxina.

Muy poco ha sido publicado en la literatura con respecto a los rendimientos, parámetros cinéticos y factores operacionales de los procesos de fermentación de *B. thuringiensis*. Algunos de los trabajos más importantes se discuten a continuación:

- 1) GOLDBERG et al. (1980) produjo *B. thuringiensis* var.

berliner en un fermentador piloto con 500 l de medio. La velocidad específica de crecimiento μ fue de 0.83 h^{-1} y obtuvo una concentración de 4×10^9 esporas/ml. Los factores operacionales fueron: temperatura de 30°C , aireación de 0.3 V.V.M. y agitación de 120 a 160 R.P.M.. El tiempo de fermentación fue de 50 horas.

2) HOLMBERG et al (1960) utilizaron una cepa de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* para la producción de exotoxina en fermentadores de 8 l (vol. de operación), y reportaron que la velocidad de aireación entre 0.1 a 1 V.V.M. no presentó efecto sobre μ . Sin embargo, a escala de 1000 l (vol. de operación) μ se redujo de $1.3 - 1.4 \text{ h}^{-1}$ a 0.95 h^{-1} . Los autores no dan explicaciones de la posible causa de esta disminución.

3) ARCAS et al (1984) cultivaron *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) en un matraz de 1000 ml conteniendo 100 ml de medio. Obtuvieron una concentración de 2.1×10^9 esporas/ml en un proceso de 48 horas de fermentación, bajo las siguientes condiciones: 200 R.P.M. y temperatura 30°C .

4) ARCAS et al (1987) usaron una cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* crecida en un fermentador con un volumen de operación de 3 l a 30°C , 0.5 V.V.M. de aireación y agitación variable para mantener el oxígeno disuelto mínimo al 20 % del valor de saturación. Encontraron que la cuenta de esporas fue incrementada de 1.08×10^9 a 7.36×10^9 esporas/ml cuando la concentración de glucosa fue incrementada de 8 a 56 g/l, con el correspondiente incremento en el resto de los componentes del medio. De la misma manera, efectuaron experimentos preliminares en cultivo por lote alimentado y obtuvieron concentraciones de $1.2 \times$

10^{10} esporas/ml.

5) DE URQUIJO (1987) empleó un fermentador de 14 l (volumen nominal) para producir *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y var. *israelensis*. Las fermentaciones fueron efectuadas a 30°C con volumen de operación y velocidad de agitación variables, obteniendo una producción de 4.2 y 4.4×10^9 esporas/ml para las var. *kurstaki* e *israelensis* respectivamente. El tiempo de fermentación en los dos casos fué de 42 horas y reportó una μ de 0.193 h^{-1} para la var. *kurstaki*.

6) PEARSON Y WARD (1988) emplearon una cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* en un proceso involucrando dos etapas para la preparación de inóculo y una etapa de fermentación de 48 horas, en un fermentador de 40 l. Obtuvieron una concentración de 6.5×10^9 CFU/ml con un porcentaje de esporulación mayor de 90 %.

7) ANDERSON (1990) utilizó una cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* crecida a 30°C , en un fermentador de 2 l de volumen nominal empleando velocidades de agitación y de aireación variables. Demostró que la producción de biomasa y de protoxina es dependiente de la relación C:N y del K_{La} .

En base a esta revisión bibliográfica se observa la importancia que tienen los factores de crecimiento (medio de cultivo, pH, temperatura y transferencia de oxígeno) sobre la producción de *B. thuringiensis*. De estos factores, la transferencia de oxígeno es crucial en la obtención de altas productividades del complejo spora-cristal. En la tabla 3.1 se presenta una evaluación comparativa de los procesos de producción

de *B. thuringiensis*.

3.6 TRANSFERENCIA DE MASA EN REACTORES BIOLÓGICOS.

En los procesos de fermentación aeróbicos uno de los aspectos más críticos es la transferencia de oxígeno al caldo de fermentación, debido principalmente a la baja solubilidad de oxígeno en sistemas acuosos (aproximadamente 7 PPM a 1 atm.). Por ejemplo, 192 g de oxígeno son requeridos para la oxidación completa de 180 g de glucosa, pero el oxígeno es aproximadamente 6000 veces menos soluble en agua que la glucosa (STANBURY Y WHITAKER, 1984).

La demanda de oxígeno de un cultivo microbiano se satisface generalmente mediante aireación y agitación del caldo de fermentación. Sin embargo, la productividad, el rendimiento y la producción de algunas fermentaciones esta limitada por la disponibilidad de oxígeno.

3.6.1 AGITACION Y AIREACION.

En la representación esquemática de un proceso de fermentación (fig. 3.1) observamos que éste consta esencialmente de tres pasos, siendo el objetivo técnico de un proceso de fermentación maximizar el transporte de materiales a través de esta secuencia. El paso 2 comprende todos los eventos bioquímicos de la transformación de sustratos a productos, mientras los pasos

**TABLA 3.1: COMPARACION DE PROCESOS DE PRODUCCION DE
Bacillus thuringiensis.**

REFERENCIA	PRODUCTIVIDAD (ESPORAS/l-h)	μ (1/h)	TIEMPO DE FERMENTACION (h)	VARIEDAD
DRAKE & SMITH* 1963	2.34×10^{10}	----	96	-----
MEGNA 1963*	3.12×10^{10}	----	72	-----
DULMAGE 1971*	3.08×10^{10}	----	60	-----
GOLDBERG et al 1980	8×10^{10}	0.83	50	berliner
ARCAS et al 1980	4.38×10^{10}	----	48	kurstaki
DE URQUIJO 1987	1×10^{11}	0.193	42	kurstaki
PEARSON Y WARD 1988	1.35×10^{11}	----	48	israelensis

* REPORTADO EN PEARSON Y WARD (1988)

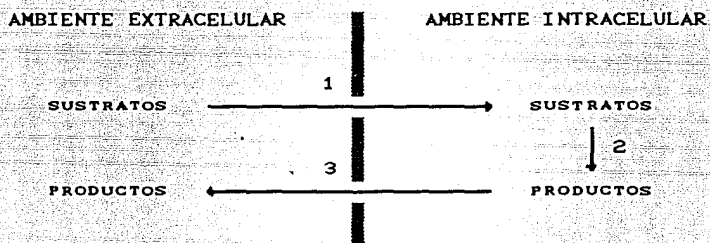


FIG. 3.1: TRES PASOS DINAMICOS EN UNA FERMENTACION.

1 y 3 representan todos los mecanismos de transporte que operan para proveer a la célula de sustratos y para remover productos. El último objetivo del desarrollo de un proceso es alcanzar la limitación debido a los factores internos de la cepa empleada a través de la optimización de las condiciones ambientales. Para alcanzar este objetivo debemos de asegurar que:

- i) La concentración de sustratos en la superficie celular sea suficiente para que los mecanismos de asimilación operen a su más alta capacidad. De la misma manera, la concentración de productos debe conservarse lo suficientemente baja para evitar posibles efectos de inhibición por producto.
- ii) Mantener condiciones óptimas de crecimiento homogéneo a través de todo el cultivo.

La primera condición se obtiene por medio de un suficiente grado de turbulencia (micromezclado) y la segunda por un suficiente grado de mezclado del líquido (macromezclado).

El transporte de sustratos hacia el interior de la célula y de productos hacia el exterior consiste en una serie de pasos o etapas. Un modelo ampliamente adoptado es la teoría de las tres películas de Lewis y Whitman (VAN T RIET, 1983; TRILLI, 1986) que considera la existencia de interfases en los fenómenos de transferencia de masa, que son controlados por una serie de resistencias difusionales. Este modelo se presenta en la figura 3.2. La experiencia muestra que la resistencia principal a la transferencia de masa está localizada en la película líquida

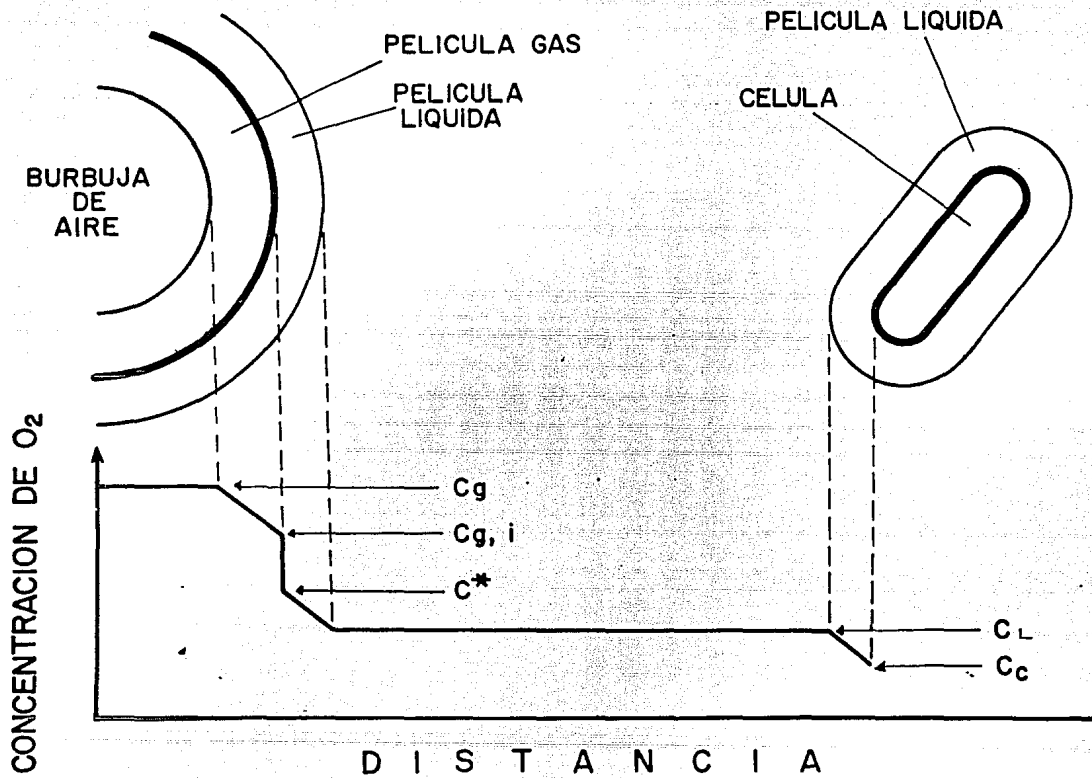


Fig. 3.2 Teoría de las tres películas de la transferencia de masa gas-líquido.

alrededor de la burbuja de gas (VARDAR-SUKAN, 1985).

Como se mencionó anteriormente un sustrato crítico para las células en los procesos aerobios es el oxígeno, la velocidad de transferencia de oxígeno a la fase líquida esta expresada por:

$$\text{OTR} = K_L a (C^* - C_L) \dots \dots \dots (3.1)$$

Donde K_L es el coeficiente de transferencia de masa basado sobre la película líquida, a es el área superficial volumétrica de las burbujas de aire y $C^* - C_L$ es la fuerza motriz para la transferencia de masa y se asume que es constante a través del fermentador, cuando el sistema está completamente mezclado. El producto $K_L a$ nos indica la capacidad de un fermentador para transferir oxígeno de la fase gas a la fase líquida (BJURSTROM, 1985; SAVAL Y GARCIA, 1987). Los valores típicos de $K_L a$ para fermentadores agitados operando a presión atmosférica y con aire se encuentran en el rango de 0.02 s^{-1} a 0.25 s^{-1} (CHARLES, 1985a; MIDDLETON, 1985).

En un cultivo aireado la velocidad de transferencia de oxígeno al caldo de fermentación debe ser al menos igual a la demanda de oxígeno del microorganismo. Por lo tanto, un caldo de fermentación es considerado adecuadamente aireado sólo si el suministro de oxígeno es mayor o igual que la demanda (BRAUER, 1987).

La velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) es función de la concentración de oxígeno disuelto (O.D.), C_L , en el medio líquido. Si la concentración de O.D. está arriba del valor

crítico, el cual es usualmente el 10 % del valor de la solubilidad de oxígeno, entonces q_{O_2} es independiente de la concentración de O.D. y es una constante (KARGI Y MOO-YOUNG, 1985).

La velocidad de asimilación de oxígeno (OUR) esta expresada por:

$$OUR = q_{O_2} X \dots\dots\dots (3.4)$$

q_{O_2} puede ser relacionado a μ por medio de:

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{O_2}} \dots\dots\dots (3.5)$$

Sustituyendo (3.5) en (3.4):

$$OUR = \frac{\mu X}{Y_{O_2}} \dots\dots\dots (3.6)$$

En el estado estacionario, OTR y OUR son iguales, esto es:

$$KLa (C^* - CL) = \frac{\mu X}{Y_{O_2}} = q_{O_2} X \dots\dots\dots (3.7)$$

OTR es máximo cuando $CL = 0$ y $q_{O_2} X_{max}$ es alcanzado cuando $\mu = \mu_{max}$. Si $KLa C^*$ es menor que $\mu_{max} X/Y_{O_2}$, entonces el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno y el oxígeno es el nutriente limitante. Cuando sucede lo contrario, el proceso está limitado por otro nutriente o por la capacidad metabólica o de transporte de nutrientes del microorganismo bajo las condiciones de operación.

Los reactores biológicos para procesos aerobios son diseñados para maximizar el valor de $K_L a$ tendiente a mantener C_L arriba del valor crítico. C^* depende de la presión parcial de oxígeno en la fase gas, T y la composición de la fase líquida. $q_{O_2} X$ es afectado por el tipo de microorganismo, velocidad específica de crecimiento, pH, T , fuente de carbón y concentración de microorganismos en el caldo de fermentación.

En un cultivo continuo X , $K_L a$ y q_{O_2} son constantes, resultando en C_L constante. Sin embargo, en un cultivo por lote $q_{O_2} X$ varía con el tiempo debido a que la concentración celular se incrementa durante el curso de la fermentación.

Como se mencionó anteriormente, en un fermentador agitado convencional, la demanda de oxígeno es satisfecha mediante agitación y aireación. La agitación tiene las siguientes funciones básicas (BRAUER, 1985; MIDDLETON, 1985):

- A) Asegurar homogeneidad del cultivo a través de macromezclado.
- B) Romper el gas en burbujas pequeñas para obtener un área superficial grande para la transferencia de masa.
- C) Dispersar las burbujas a través del líquido.
- D) Promover la transferencia de calor.

Todas estas funciones requieren del gasto de energía mecánica, la cual es suministrada por el movimiento de uno o varios impulsores. Esta energía eventualmente es disipada en forma

de calor. El impulsor más usado en procesos de fermentación u operaciones de contacto gas-líquido es la turbina "Rushton" (JOSHI et al., 1982; OLDSHUE, 1983; MIDOUX Y CHARPENTIER, 1984; MIDDLETON, 1985; VARDAR-SUKAN, 1986), debido a que se obtienen con ella los valores de $K_L a$ más altos y simultáneamente altas velocidades de corte o turbulencia. Su principal importancia radica en la presencia del disco estabilizador, el cual hace que el aire alimentado al fermentador sea introducido a la zona de baja presión debajo de la turbina, y posteriormente fluya a la zona de alto esfuerzo de corte para ser dispersado con un patrón de flujo radial. Debido al patrón de flujo radial uniforme que presentan las turbinas Rushton, tienden a entregar más potencia que los impulsores de flujo axial (propelas marinas), por lo tanto las turbinas Rushton son más eficientes que las propelas marinas desde el punto de vista de transferencia de oxígeno.

La potencia transferida al líquido por un impulsor está correlacionada por el número de Newton o número de potencia del impulsor (OLDSHUE, 1983; MIDDLETON, 1985):

$$N_p = \frac{P_o}{N^3 D_1^5 \rho} \dots \dots \dots (3.8)$$

mientras que el número de Reynolds es una medida de la turbulencia del sistema y expresa la relación de la fuerzas de inercia a las fuerzas viscosas en el líquido (OLDSHUE, 1983; MIDDLETON, 1985):

$$N_{Re} = \frac{N D_1^2 \rho}{\mu} \dots \dots \dots (3.9)$$

El número de Potencia es función del número de Reynolds de acuerdo a:

$$N_p = K (N_{Re})^m \dots\dots\dots (3.10)$$

Para condiciones de flujo laminar ($N_{Re} < 10^4$) $m = 1$; para flujo turbulento ($N_{Re} > 10^4$) $m = 0$ y por lo tanto el número de potencia es esencialmente constante (igual a 6) e independiente del N_{Re} (turbina "Rushton" estandar); para un flujo de transición ($10 < N_{Re} < 10^4$) no hay una expresión analítica disponible. Así mismo, la formación de cavernas en los impulsores disminuye el consumo de potencia.

Un factor adicional que afecta la transferencia de masa es la velocidad de aireación. Sus funciones en una fermentación aeróbica son fundamentalmente dos (BYLINKINA Y BIRUKOV, 1972):

- A) Suministrar oxígeno al cultivo.
- B) Eliminar CO_2 y otros metabolitos volátiles.

Con respecto a la primera función, el efecto del flujo de aire es muy complejo y está entrelazado con la agitación. En relación a la segunda función, también conocida como "ventilación", es importante hacer notar que la formación de ciertos productos es inhibida por CO_2 mientras que para otros es favorecida por este gas. Los factores de aireación que contribuyen a la transferencia de oxígeno son: el tamaño de burbuja, el porcentaje de gas retenido ("hold-up") y la potencia que adiciona al sistema debido a la expansión del gas al entrar al fermentador.

Cabe aclarar que la potencia introducida al fermentador por expansión es usualmente despreciable con respecto a la potencia suministrada por agitación, aunque CAHUE (1990) ha encontrado que en algunos casos la potencia por aireación es ligeramente superior a la potencia disipada por agitación.

El KLa se ha relacionado con la potencia impartida al sistema y en la literatura se encuentran frecuentemente ecuaciones con la siguiente forma general (VAN'T RIET, 1979; NISHIKAWA et al, 1981; JOSHI et al, 1982; LEE Y LUK, 1983; CHARLES, 1985a):

$$KLa = K \left(\frac{Po}{V} \right)^\alpha \left(V_s \right)^\beta \dots \dots \dots (3.7)$$

En estas ecuaciones existe una gran variación en los valores de las constantes K , α y β . Las principales causas son las siguientes:

- 1) Las propiedades fisicoquímicas de los líquidos. La presencia de electrolitos incrementa el valor de los exponentes y el valor absoluto de KLa , debido a que evita el fenómeno de coalescencia de las burbujas y aumenta el área superficial de las mismas (ROBINSON Y WILKE, 1972; ZLOKARNIK, 1978).
- 2) La escala de fermentación. El exponente decrece con el aumento de escala debido a la disminución del efecto de la aireación superficial (FUCHS et al, 1974).
- 3) El número y tipo de impulsores (METHA Y SHARMA, 1974)

4) El tipo de fermentador (su geometría).

3.7 ESCALAMIENTO DE PROCESOS.

Escalamiento es el conjunto de técnicas y metodologías empleadas para transferir a una escala mayor o menor un proceso de fermentación. El escalamiento a una escala mayor se conoce como escalamiento ascendente y a una escala menor como escalamiento descendente. El escalamiento es una tarea interdisciplinaria que requiere el uso combinado e integrado de metodologías y conceptos de ingeniería química, bioquímica, microbiología y genética.

Al escalar procesos biotecnológicos basados en el crecimiento de células microbianas, vegetales o animales, algunos factores son mantenidos constantes, mientras que otros son variables (tabla 3.2). Un ejemplo típico es el efecto del cambio de escala sobre el área de transferencia de calor. En fermentadores geoméricamente similares y de diferente volumen, el área es proporcional al cuadrado del diámetro del fermentador ($A \propto D_T^2$) y el volumen proporcional al cubo del mismo diámetro ($V \propto D_T^3$). Por lo tanto, mientras más grande sea el fermentador menor área para la transferencia de calor tendrá (AIBA et al, 1973; SALVADOR, 1988).

Otro problema típico es que en los fermentadores industriales el rendimiento de producto es menor al obtenido a escala de laboratorio. Esto es causado por diferencias en el desempeño del fermentador a diferentes escalas. A escala de producción el consumo de potencia está restringido por razones económicas y

FACTORES CONSTANTES	FACTORES VARIABLES
<ul style="list-style-type: none">- MEDIO DE CULTIVO- TEMPERATURA- pH- RELACION DE INOCULO	<ul style="list-style-type: none">- TRANSF. DE MASA- TRANSF. DE CALOR- CONSUMO DE POTENCIA- TIEMPO DE MEZCLADO- GEOMETRIA DEL SISTEMA

TABLA 3.2: FACTORES QUE SON CONSIDERADOS AL ESCALAR UN PROCESO DE FERMENTACION.

mecánicas, causando problemas de mezclado y de transferencia de oxígeno y calor. (SWEERE et al. 1987).

En el escalamiento o diseño de fermentadores, son importantes tres clases de fenómenos:

- 1) Fenómenos termodinámicos.
- 2) Fenómenos microcinéticos.
- 3) Fenómenos de transporte.

De estos fenómenos, el primero y el segundo (procesos bioquímicos celulares) son independientes de la escala, no siendo así con el tercero, ya que el oxígeno y otros nutrientes involucrados en los procesos fermentativos tienen que ser suministrados por procesos de transporte. El hecho de que la eficiencia de los procesos de transporte difiera a diferentes escalas tiene importantes consecuencias para el desarrollo de los microorganismos. Estas diferencias se presentan básicamente como gradientes de concentración, temperatura, pH, presión, así como altos esfuerzos de corte (KASZAB et al. 1981). La presencia de estos gradientes hace que el microorganismo sea sometido a un "stress", el cual generalmente resulta en una caída de los rendimientos del proceso en cuestión.

3.7.1 METODOS DE ESCALAMIENTO.

Para realizar el escalamiento de procesos de fermentación se han desarrollado varios métodos de escalamiento. KOSSEN y OOSTERHUIS (1985) han revisado los diferentes métodos de

escalamiento. Estos métodos son:

- A) Método fundamental.
- B) Método semifundamental.
- C) Análisis dimensional.
- D) Prueba y error.
- E) Escalamiento descendente ("Scale-Down").
- F) Reglas empíricas ("Rules of Thumb").

A continuación se discutirán brevemente cada uno de los métodos.

3.7.1.1 METODO FUNDAMENTAL.

Para emplear este método se deben de establecer microbalances para las transferencias de momentum, calor y masa. BIRD et al (1960) hace un tratamiento extensivo a este respecto. El principal problema de este método es la imposibilidad de resolver el microbalance para momentum (la solución del balance de momentum da los componentes de flujo a ser usados en los balances de calor y masa). Como resultado el método fundamental es usado solo para sistemas muy simples tales como:

- Condiciones de flujo bien definidas (flujo laminar de una película líquida).
- Ausencia de flujo (procesos controlados por difusión). Se aplica para sistemas de células o enzimas inmovilizadas.

3.7.1.2 METODO SEMIFUNDAMENTAL.

Este método se caracteriza por emplear ecuaciones simplificadas, particularmente para momentum (KHANG Y LEVENSPIEL, 1976). Por lo cual los problemas del método fundamental son evitados. Los modelos de momentum generalmente usados son:

- Flujo tapón.
- Flujo tapón con dispersión.
- Mezclado completo.

El modelo de un tanque completamente mezclado es el más usual, debido a su simplicidad.

El método semifundamental es junto con las reglas empíricas el de mayor uso. Sin embargo, los modelos de momentum mencionados usualmente resultan de observaciones en aparatos a pequeña escala (10 a 100 l), lo que hace que el escalamiento basado en estos modelos sea riesgoso.

3.7.1.3 ANALISIS DIMENSIONAL.

Este método es bastante útil aunque presenta serias limitaciones. El análisis dimensional (AD) es una técnica donde grupos dimensionales de factores son conservados constantes durante el escalamiento. Sus limitaciones básicas son:

- A) A menudo no es posible conservar todos los grupos dimensionales constantes durante el escalamiento. Uno tiene entonces que determinar los grupos dimensionales más

importantes, despreciando el resto.

B) La aplicación formal del AD lleva frecuentemente a situaciones técnicas no reales (consumo de potencia, velocidad de agitación, etc.).

C) Algunos sistemas son autónomos: Por ejemplo, el tamaño de burbuja en sistemas coalescentes es independiente de la escala y de las condiciones del proceso. Esto viola los conceptos básicos del AD formal tal como la similitud geométrica.

C) La selección de factores involucrados en el AD no siempre es obvia y algunas veces es arbitraria.

3.7.1.5 PRUEBA Y ERROR.

Este método fue durante mucho tiempo el único disponible para el mejoramiento de procesos. Aún se encuentra en uso para la optimización gradual de procesos, pero no para escalamiento.

3.7.1.6 ESCALAMIENTO DESCENDENTE.

Bajo esta perspectiva, los experimentos a pequeña escala son desarrollados bajo condiciones ambientales comparables a las que pueden efectuarse a escala de producción. Estas condiciones pueden ser entre otras: OTR, tiempo de mezclado y esfuerzo de corte (OLDSHUE, 1966). Esta metodología es mostrada esquemáticamente en la fig. 3.3.

3.7.1.6 METODO EMPIRICO (RULES OF THUMB).

En la práctica, la aplicación de los enfoques de escalamiento

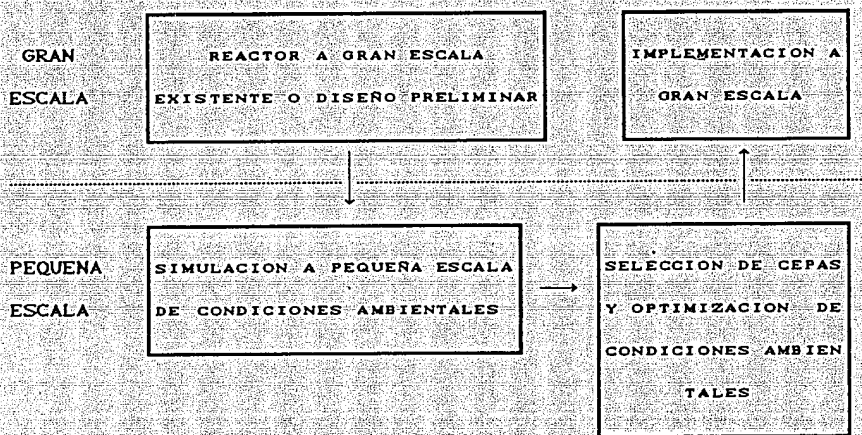


FIG. 3.3 : ESCALAMIENTO DESCENDENTE (KOSSEN et al., 1985).

discutidos es difícil. Sin embargo, han sido desarrollados métodos empíricos basados en la experiencia y en conceptos de similitud y de grupos dimensionales. Estos métodos generalmente están basados en el hecho de que variables importantes de proceso tal como el consumo de potencia, coeficientes de transferencia de calor y masa, etc., pueden relacionarse a la geometría del sistema, velocidad de agitación, propiedades físicas, etc., por medio de grupos dimensionales. Por ejemplo, el consumo de potencia en un fermentador agitado está correlacionado por medio de:

$$Np = \delta NRe^{\gamma} f(\text{geometría}) \dots\dots\dots(3.12)$$

En muchos casos, las correlaciones publicadas no incluyen términos para los efectos de la geometría del sistema, y se debe esperar que las constantes de tales correlaciones sean dependientes de la escala, si la similitud geométrica no es mantenida.

Ahora bien, el escalamiento de procesos de fermentación idealmente debería basarse en las variables de diseño y en las condiciones de operación del biorreactor. Sin embargo, en la mayoría de los casos se dispone de cierto equipo, y por lo tanto, no hay forma de modificar prácticamente el diseño original, por lo que se deben de evaluar una serie de variables y sus interrelaciones; lo cual eventualmente permitirá igualar, en lo posible, las condiciones de operación. Estas variables incluyen: Q , $K_L a$, NRe , V_0 y algunas variables de diseño y operación como la velocidad de agitación y D_i . Los criterios de escalamiento son

entonces las variables que deberán mantenerse constantes al trasladar las condiciones del proceso durante el escalamiento. Los criterios de escalamiento más conocidos son (SAVAL Y GARCIA, 1987):

- A) P_0/V constante.
- B) $K_L a$ constante.
- C) v_{tip} constante.
- D) t_m constante.
- E) N_{Re} constante.
- F) Q/V constante.

EINSELE (1976, 1978) examinó los criterios de escalamiento utilizados por 30 empresas de fermentación esparcidas alrededor del mundo. De acuerdo a las respuestas el mayor énfasis recayó en los criterios de consumo de potencia, transferencia de oxígeno y velocidad de punta de impulsor (tabla 3.3). Pero en realidad estos criterios fueron raramente aplicados. Estos resultados indican además, que no hay una tendencia particular a escoger un criterio de escalamiento sobre otro.

MARGARITIS Y ZAJIC (1978) mencionan a su vez que los criterios de escalamiento más usados son: N_{Re} , v_{tip} , $K_L a$ y tiempo de mezclado. Así mismo, indican que la selección del criterio de escalamiento dependerá de la economía del sistema y de los requerimientos particulares del proceso. Estos criterios al igual que los de la tabla 3.3 están relacionados entre sí y se refieren principalmente a la transferencia de oxígeno.

% DE INDUSTRIAS	CRITERIO DE ESCALAMIENTO USADO
30	P/V CONSTANTE
30	$K_L a$ CONSTANTE
20	U_{lp} CONSTANTE
20	pO_2 CONSTANTE

TABLA 3.3: CRITERIOS DE ESCALAMIENTO EMPLEADOS EN LA INDUSTRIA DE FERMENTACION EUROPEA (EINSELE, 1978).

Uno de los trabajos más importantes del método empírico y al cual muchos autores hacen referencia, es el trabajo de OLDSHUE (1966). En él se muestra la estrategia particular de mantener un factor específico constante, para observar como se comportan los demás factores a mayor escala en sistemas geoméricamente similares. Este ejercicio se presenta en la tabla 3.4 y muestra el escalamiento de un volumen modelo (V_m) de 10 l a un volumen de 10 m³. Como ya se mencionó, un criterio muy usado es mantener P_0/V constante. Sin embargo, como se observa de la tabla 3.4, este criterio resulta en un considerable incremento de t_m y ND, lo cual puede tener un efecto sobre la productividad a escala de producción si se emplea un microorganismo sensible al esfuerzo de corte. Por lo tanto se puede concluir que diferentes criterios de escalamiento resultan en condiciones de proceso completamente diferentes a escala de producción.

En general, si se desea aplicar un método empírico exitosamente, se debe ser capaz de identificar los factores más importantes (transferencia de oxígeno, corte, etc.) y mantenerlos constantes en el escalamiento. Obviamente no se pueden mantener constantes todos los factores y se debe suponer que estos no variarán lo suficiente para afectar el proceso de fermentación a una escala mayor.

En la práctica, usualmente es difícil escalar un proceso de fermentación de una escala a otra, particularmente un proceso aerobio involucrando caldos no newtonianos. Este problema es raramente tratado en la literatura de una manera directa, o de una manera racionalmente cuantitativa. Además, mucha de la información

VALOR A ESCALA DE $10 \text{ m}^3 \text{ (Vm} = 10 \text{ l)}$						
CRITERIO	P	P/V	N	NDi	N_{Re}	N/Di
P/V	10^3	1	0.22	2.15	21.5	0.022
N	10^5	10^2	1	10	10^2	0.1
NDi	10^2	0.1	0.1	1	10	10^{-2}
N_{Re}	0.1	10^{-4}	10^{-2}	0.1	1	10^{-3}
N/Di	10^8	10^5	10	10^2	10^3	1

TABLA 3.4: DIFERENTES CRITERIOS DE ESCALAMIENTO Y SUS CONSECUENCIAS (KOSSEN et al., 1985).

y filosofías publicadas en la literatura en relación al tema es excesivamente limitada, ya que las correlaciones producidas están restringidas en su uso a fermentadores relativamente pequeños, aunado a que poca o ninguna atención ha sido puesta a la reología y otras propiedades físicas. Además, solo en muy pocos estudios han sido usados caldos de fermentación y esto no ha producido correlaciones útiles.

En base a lo anterior podemos afirmar que no hay bases para decir que un escalamiento puede ser exitoso empleando tal o cual metodología. Cada caso debe ser abordado de una manera particular, poniendo énfasis en el paso limitante del proceso y utilizando toda la experiencia acumulada. El escalamiento de procesos tiene aun muchas bases artesanales.

3.7.2 EJEMPLOS DE ESCALAMIENTO DE PROCESOS FERMENTATIVOS.

En la literatura existe publicada una cantidad mínima de ejemplos prácticos para el escalamiento de reactores a nivel planta piloto e industrial. Aún así, hay una cantidad enorme de reactores industriales funcionando en el mundo.

A continuación se discutirán algunos de los trabajos de escalamiento más importantes que aparecen en la literatura.

1) KAROW et al (1959) escalaron los procesos de producción de penicilina y estreptomocina en reactores agitados, cuyos volúmenes variaron de 5 l a 15000 galones. El criterio de escalamiento empleado en ambos casos fue el Coeficiente de Absorción de Oxígeno determinado por el método del sulfito de COOPER et al

(1953).

2) JARAI (1972) escaló diferentes procesos empleando cepas de *Streptomyces* y *Aspergillus* para la producción de antibióticos y cepas de *Aspergillus* y *Bacillus* para la producción de enzimas. Los volúmenes de operación de los fermentadores empleados fueron de 6, 3000 y 20000 l. El criterio de escalamiento fue $K_L a$ y los fermentadores fueron caracterizados por el método de oxidación de sulfito de COOPER et al. (1953).

3) BLAKEBROUGH Y MORESI (1981) escalaron una fermentación de suero empleando una cepa de *Kluyveromyces fragilis* para reproducir a mediana escala (100 l) los resultados obtenidos en laboratorio (5 l). Ellos desarrollaron un procedimiento estandar para el crecimiento del inóculo y para la pasteurización del medio. Los problemas de aireación y de agitación fueron resueltos escalando a $K_L a$ constante, ya que es el factor que controla esta fermentación.

4) JAIN Y BUCKLAND (1988) escalaron un proceso de fermentación de efrotomicina usando una planta piloto (Merck Sharp and Dohme Research Laboratories) controlada por computadora. La cepa productora de antibiótico fue una mutante de *Nocardia lactamdurans*. El escalamiento fue conducido en fermentadores de tres distintos tamaños: 0.8 m³, 1.9 m³ y 19 m³. Los tanques eran geoméricamente similares y fueron equipados con 2, 3 y 4 turbinas Rushton respectivamente. El escalamiento del proceso fue mediante un criterio "dual". Esto es, el primer criterio fue desarrollar un modelo para escalar el proceso de esterilización generado en base a datos tomados de fermentaciones a pequeña escala. El segundo criterio fue escalar a $K_L a$ constante. Es importante mencionar que

el criterio para escalar el proceso de esterilización fue desarrollado debido a que el medio de producción es muy sensible a pequeños cambios en las condiciones de esterilización. La esterilización y la velocidad de agitación fueron controladas automáticamente a gran escala.

5) FLICKINGER et al (1960) escalaron el proceso de producción de toyocamicina (antibiótico nucleosídico) utilizando una mutante de *Streptomyces chrestomyceticus* generada por irradiación con luz ultravioleta. El escalamiento se efectuó utilizando el criterio de v_{lp} constante, ya que esta mutante es sensible al esfuerzo de corte. Además la máxima productividad del antibiótico está inversamente relacionada con v_{lp} . Los autores determinaron que manteniendo v_{lp} constante en el escalamiento, empleando fermentadores geoméricamente similares, la máxima productividad del antibiótico se duplica. El fermentador piloto (120 l) fue usado para determinar la relación entre la máxima productividad del antibiótico, la velocidad de asimilación de oxígeno (OUR) y la velocidad de producción de CO_2 . Esta técnica permitió a los investigadores la predicción del título del antibiótico y de la máxima productividad del antibiótico en base a los porcentajes de O_2 y CO_2 en el gas de salida para el fermentador de 12000 l.

En la tabla 3.5 se esquematiza la información de escalamiento presentada.

FUENTE	PRODUCTO	ESCALA	CRITERIO
KAROW et al (1953)	ANTIBIOTICOS	5 l A 50000 l	Coef. Abs. Oz
JARAI (1972)	ANTIBIOTICOS ENZIMAS	6 l A 3000 l A 20000 l	KLa
BLAKEBROUGH Y MORESI (1981)	BIOMASA	5 l A 100 l	KLa
JAIN Y BUCKLAND (1988)	ANTIBIOTICOS	0.8 m ³ a 1.9 m ³ A 19 m ³	KLa
FLICKINGER et al (1988)	ANTIBIOTICOS	120 l A 12000 l	V _{ltp}

TABLA 3.5: EJEMPLOS DE ESCALAMIENTO DE PROCESOS FERMENTATIVOS.

4- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

4.1 JUSTIFICACION.

Considerando que el uso de productos químicos en el control de plagas ha perdido efectividad al aumentar la resistencia de los insectos a estos compuestos, amén de la contaminación ambiental que producen, el control biológico empleando microorganismos entomopatógenos es una alternativa atractiva.

Al no contar México con una tecnología para obtener bioinsecticidas en grandes cantidades, se ha planeado el desarrollo de un proceso competitivo para producir un insecticida biológico empleando *Bacillus thuringiensis*. Esto permitirá controlar plagas de lepidópteros, dípteros y coleópteros que aquejan nuestros campos productivos y la salud en zonas tropicales.

4.2 OBJETIVO GENERAL.

Escalar la etapa de fermentación del proceso de producción de *Bacillus thuringiensis* de nivel de laboratorio a planta piloto, con el propósito de producir un bioinsecticida con actividad biológica comparable a bioinsecticidas comerciales.

4.3 OBJETIVOS PARTICULARES.

A) Determinar las condiciones de operación (aireación y agitación) a nivel de laboratorio (RB 14) para la máxima producción de *Bacillus thuringiensis*.

B) Caracterizar el fermentador de laboratorio RB 14 en base a

K_{La} y OTR.

C) Adecuar y arrancar el fermentador RN 1000 de planta piloto.

D) Caracterizar el fermentador RN 1000 de planta piloto en base a K_{La} y OTR.

E) Escalar el proceso de nivel de laboratorio a planta piloto, empleando el criterio de OTR constante.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 MICROORGANISMO

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* cepa HD 73, tipo de cristal K-73. Adquirido del Cotton Insect Research Laboratories de Brownsville, Texas U.S.A..

5.2 CONSERVACION DEL MICROORGANISMO

El cultivo fué conservado en tubos inclinados y cajas petri conteniendo agar nutritivo (Bioxon). Después de sembrar los tubos y cajas se incubaron por 48 h y de 72-96 h respectivamente a 30°C. Una vez crecidos se conservaron en refrigeración a 4 °C por 6 meses.

5.3 MEDIOS DE CULTIVO

Se emplearon los siguientes medios de cultivo durante el desarrollo del proyecto de investigación:

5.3.1 MEDIO DE PROPAGACION. Caldo Nutritivo (Bioxon).

5.3.2 MEDIO DE FERMENTACION. Medio M-25 descrito por DE URQUIJO (1987).

5.3.3 MEDIO MP. Similar al medio de fermentación sólo que no contiene sales. Se le adicionó además CaCO₃ en proporción de 1 g/l, como amortiguador del pH.

5.3.4 MEDIO PARA PRUEBA DE ESTERILIDAD. Elaborado con los siguientes compuestos: glucosa 10 g/l, sulfato de amonio 2 g/l, sulfato de magnesio 0.1 g/l, cloruro de potasio 0.1 g/l y levadura termolizada 0.1 g/l.

5.4 PREPARACION DE LOS MEDIOS.

En virtud de que la harina de sangre (HS) y la levadura de cerveza (LC) requieren de un tratamiento previo a su empleo como sustratos, para solubilizar sus componentes, se les hizo un tratamiento ácido-térmico junto con el agua de cocimiento de maíz (ACM) (DE URQUIJO, 1987).

5.5 DESARROLLO DE INOCULO Y CULTIVO POR LOTE EN LABORATORIO.

De un tubo inclinado conteniendo el cultivo de *B. thuringiensis* se tomó una asada y se suspendió en un matraz erlenmeyer de 500 ml el cual contenía 140 ml de caldo nutritivo, el matraz se incubó en una agitadora rotatoria (New Brunswick Scientific Co. modelo R-25) durante 12 h a 100 R.P.M. y 30°C. Posteriormente este inóculo fué transferido al reactor RB 14 conteniendo 7 l del medio M-25 ya tratado y esterilizado, se incubó a 30°C y pH 7. La aireación se mantuvo constante a 1 V.V.M y la velocidad de agitación fue variable (describiéndose en conjunto con los resultados). El caldo se cosechó al alcanzar aproximadamente el 90 % de esporulación.

5.6 DESARROLLO DE INOCULO Y CULTIVO POR LOTE EN PLANTA PILOTO.

Las esporas contenidas en una caja de petri se suspendieron en un matraz erlenmeyer de 1000 ml, conteniendo 300 ml de caldo nutritivo. Posteriormente el matraz se incubó en una agitadora rotatoria (New Brunswick Scientific Co. modelo R-25) a 200 R.P.M. y 30°C durante 6 h. Este inóculo se transfirió al reactor RC 30 conteniendo 14 l de medio MP, donde se incubó a

600 R.P.M., 1 V.V.M., 30°C y pH 7 durante 6-7 h. Posteriormente el inóculo fué transferido al reactor RN 1000 conteniendo 700 l de medio M-25 ya tratado y esterilizado. La fermentación se llevó a cabo a diferentes condiciones de aireación y de agitación. El caldo fermentado, al igual que a nivel de laboratorio, se cosechó al alcanzar un 90 % de esporulación.

5.7 FERMENTADORES.

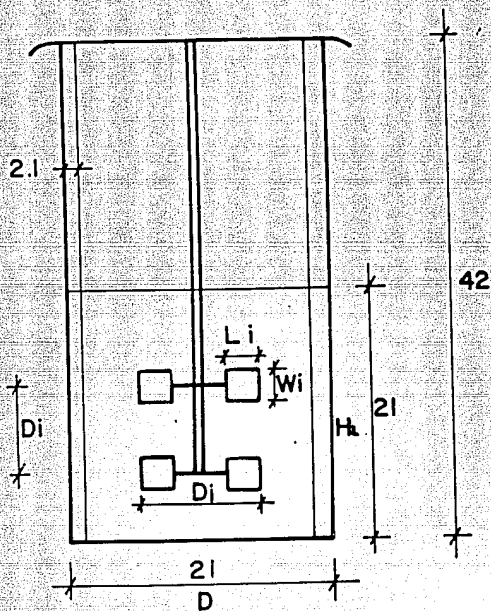
Durante el curso del proyecto se emplearon los siguientes fermentadores:

RB 14: Fermentador New Brunswick Scientific Co. (NBS) Labferm para 3 vasos de 14 l modelo CFS-314 de configuración estandar, con control de pH, espuma y temperatura. El volumen de operación en todos los casos fué de 7 l y el sistema de agitación constó de dos turbinas tipo Rushton.

RC 30: PEC-REACTOR de 30 l de capacidad total con velocidad de agitación variable, fabricado por Chemap A.G.. El volumen de operación fué de 14 l.

RN 1000: Fermentador de 1100 l de volumen nominal diseñado en el CINVESTAV, el cual cuenta con sistema de enfriamiento por chaqueta. El sistema de agitación es de velocidad variable y emplea un motor hidráulico Sai Spa, tipo MTCP de 10 Hp de potencia. El volumen de operación fue de 700 l en todos los casos. El sistema fué agitado con dos turbinas tipo Rushton.

En las figuras 5.1 a 5.3 se presentan diagramas con las características geométricas de los reactores RB 14 y RN 1000.



Acot: en cms.

Volumen de operación = 7.1

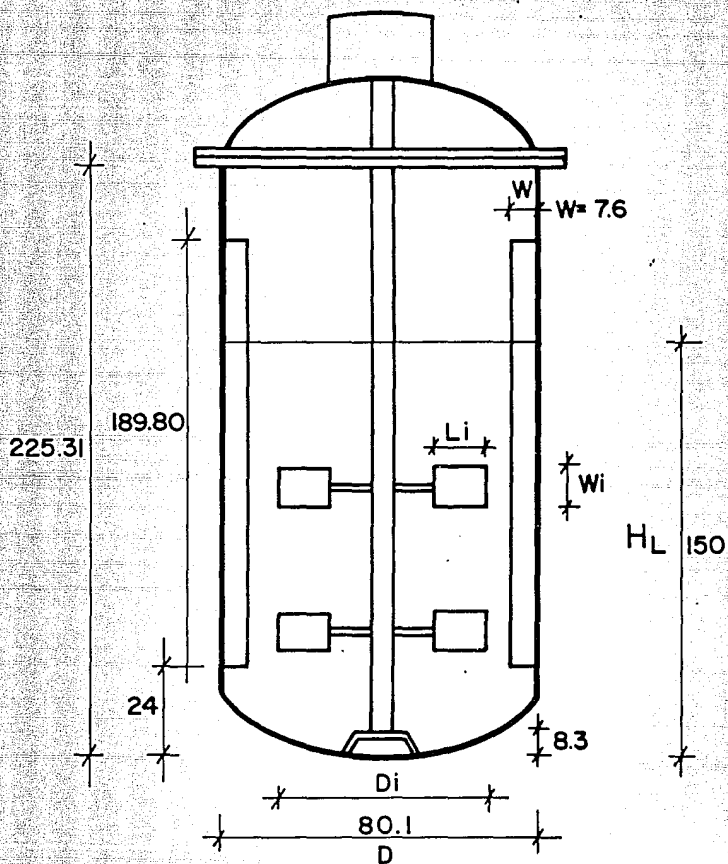
$H_L / D = 1$

$D / D_i = 3$

$L_i / D_i = 0.25$

$W_i / D_i = 0.20$

Fig. 5.1 Características geométricas del fermentador RB 14



Acot. en cms.

Volumen de Operación = 700 l

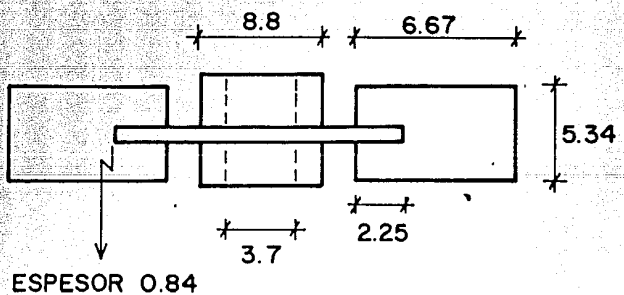
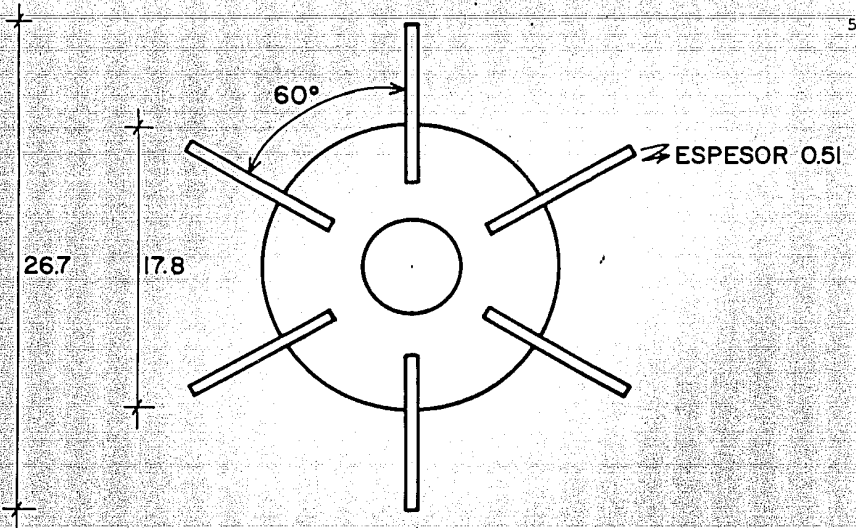
$H_L / D = 1.87$

$D / D_i = 3$

$L_i / D_i = 0.25$

$W_i / D_i = 0.20$

Fig. 5.2 Fermentador RN 1000.



Acot.: en cms

Fig. 5.3 Impulsor y sus características geométricas RN 1000.

5.8 CONTROL DEL PROCESO E INSTRUMENTACION EN EL RB 14.

Se controló pH por medio de un equipo de Horizon Ecology Co. modelo 5997-20 y de un electrodo para medición de pH Ingold tipo 465.

La medición de oxígeno disuelto (O.D.) en el seno del fermentador se llevó a cabo con un D.O. Analyzer de NBS y un electrodo para medición de O.D. NBS serie 900.

La fracción de oxígeno en los gases de salida del fermentador fué determinada con un analizador de oxígeno Taylor Servomex OA 272.

5.9 CONTROL DEL PROCESO E INSTRUMENTACION EN RC 30 Y RN 1000

El control de pH, O.D. y temperatura se efectuó con instrumentación diseñada y construida en la Planta Piloto de Fermentaciones del CINVESTAV. Así mismo se emplearon dos electrodos: electrodo de pH Ingold tipo 465 y electrodo Polarográfico para O.D. Ingold modelo 81783.

Los gases de salida del fermentador RN 1000 fueron analizados con un analizador de oxígeno Servomex 540 A y un analizador Servomex Infrarojo de CO₂ modelo Ana Tek PSA 402.

5.10 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.

El crecimiento microbiano se cuantificó mediante los siguientes métodos:

5.10.1 CUENTA TOTAL: Se contaron las células vegetativas y esporas en la cámara de Neubauer, bajo el microscopio de contraste de fases. El método es descrito por DE URQUIJO (1987), solo que en

este caso se emplearon diluciones desde 1:10 hasta 1:1000. Cabe aclarar que en las cinéticas que se reportan en el presente trabajo, la concentración de células/ml (X_E) se considera solo hasta antes de que estas esporulen. La concentración final se reporta como esporas/ml (X_E).

5.10.2 AZUCARES REDUCTORES: La determinación de azúcares reductores en el caldo de fermentación fue efectuada por el método del ácido dinitrosalicílico descrito por MILLER (1959).

5.11 DETERMINACION DEL RENDIMIENTO EN BASE A SUSTRATO ($Y_{x/s}$)

$Y_{x/s}$ fue calculado con la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \dots \dots \dots (5.1)$$

Se empleó un peso unitario de *B. thuringiensis* de 2.295 ng (RODRIGUEZ, 1990) para determinar los valores de X y X_0 .

5.12 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO (OTR) Y DEL COEFICIENTE VOLUMETRICO DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO ($K_L a$).

La elección del método para determinar $K_L a$ se hizo entre el método del balance descrito por MUKHOPADHYAY Y OHOSE (1970) y el método dinámico (BANYOPADHYAY et al, 1967). Se eligió el método del balance ya que presenta ventajas frente al método dinámico, tales como:

- A) Considera el comportamiento del oxígeno a la entrada y

salida del fermentador, en el caldo de cultivo y en la célula.

- B) No crea disturbios en la fermentación.
- C) No depende del tiempo de respuesta del electrodo.
- D) El método dinámico funciona adecuadamente con valores de $K_L a$ menores a 450 h^{-1} .

Este método fué aplicado tanto al sistema biológico como al sistema químico con sulfito de sodio para la caracterización por $K_L a$ y OTR de los fermentadores RB 14 y RN 1000.

Las concentraciones usadas con el sistema químico fueron las siguientes (los reactivos empleados fueron grado técnico):

- Na_2SO_3 , 35.2 g/l (0.2 M)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0.249 g/l (1 mM, catalizador)

Las ecuaciones del método del balance se desarrollan en el apéndice "A".

5.13 DETERMINACION DE $K_L a$ POR EL METODO DE SULFITO ALIMENTADO.

Efectuado de acuerdo a lo reportado por IMAI et al (1967).

Las concentraciones de reactivos usados fueron:

- Na_2SO_3 , 12.6 g/l alimentado a un flujo de $5.747 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$.
- CuSO_4 , $1.42 \times 10^{-6} \text{ M}$.

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1 CARACTERIZACION BIOLÓGICA DEL FERMENTADOR RB 14 Y ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE ESCALAMIENTO.

Para la caracterización biológica del fermentador RB 14 se utilizaron en principio las condiciones reportadas por DE URAUJO (1967), modificándose el número de impulsores del fermentador y su distribución en la flecha del agitador.

El objetivo de disminuir el número de impulsores fue el de obtener mayor eficiencia de mezclado, ya que se utilizaban tres impulsores con una distancia entre los mismos de D . Según OLDSHUE (1968), en sistemas con impulsores múltiples, la separación entre ellos debe ser como mínimo de $1.5 D$ para no alterar los patrones de flujo y con ello la eficiencia del mezclado. Además el tercer impulsor quedaba cerca de la superficie, generando problemas de espuma. Se emplearon dos impulsores y su distribución en la flecha del fermentador se hizo de acuerdo a las relaciones reportadas como estandar por AIBA et al (1973).

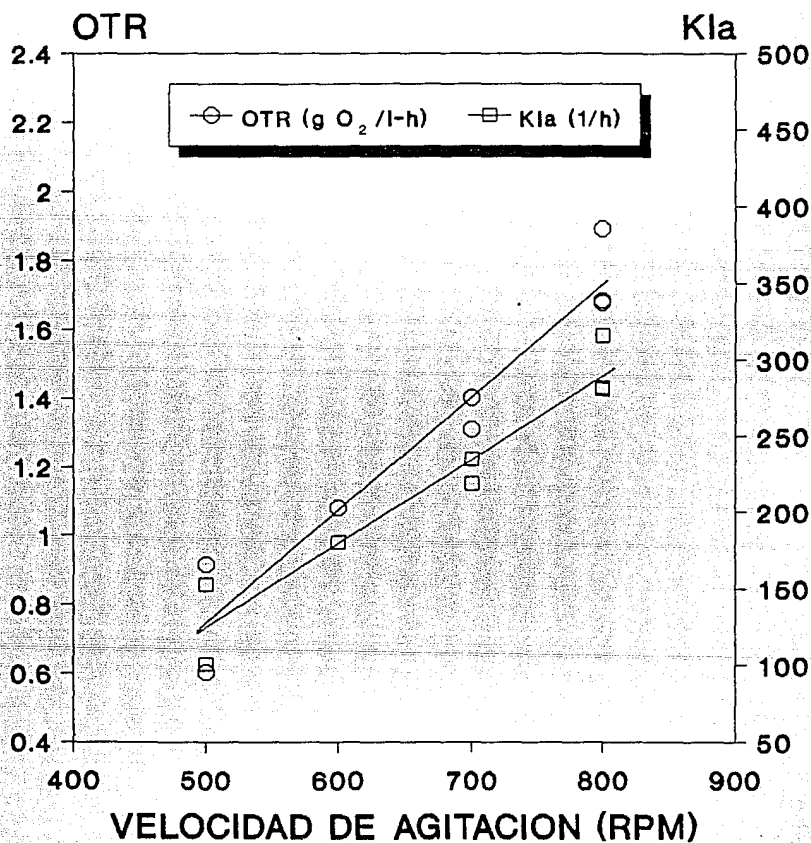
Se llevaron a cabo fermentaciones para la caracterización biológica del fermentador RB 14, en base a $K_L a$ y OTR. Las fermentaciones se efectuaron a velocidad de aireación constante (1 VVM) y velocidad de agitación variable (500, 600, 700 y 800 RPM). Los resultados se presentan en la tabla 6.1 y figuras 6.1 y 6.2.

De los resultados presentados en la tabla 6.1 se observa que conforme se aumenta la velocidad de agitación, se eleva la concentración final de esporas (X_E), ésta se elevó en 20.5 % y

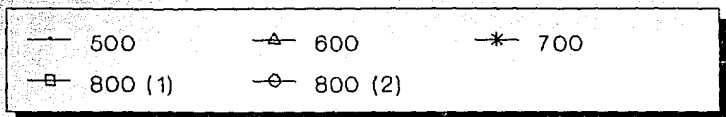
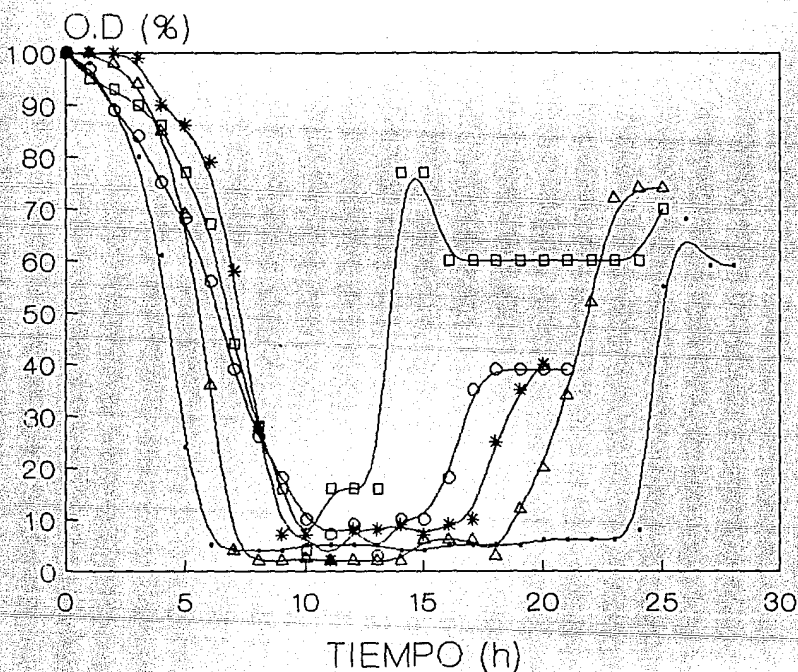
RPM	500	600	700	800
X_E	3.6×10^9	3.6×10^9	4.2×10^9	4.4×10^9
(ESPORAS/ml)	3.2×10^9	3.6×10^9	4.0×10^9	4.7×10^9
\bar{X}	3.4×10^9	3.6×10^9	4.1×10^9	4.8×10^9
$Y_{X/S}$	ND	0.289	0.3255	0.334
(g cel/g glucosa)	0.276	ND	ND	0.340
$\bar{Y}_{X/S}$				0.391
				0.355
T. FERMENTACION	40	28	30	26
(h)	38	28	24	27.5
$\bar{T.F.}$				23
	39	28	27	25.5
P_v	9.0×10^{10}	1.3×10^{11}	1.4×10^{11}	1.7×10^{11}
(ESPORAS/L-h)	8.5×10^{10}	1.3×10^{11}	1.66×10^{11}	1.65×10^{11}
\bar{P}_v	8.75×10^{10}	1.3×10^{11}	1.53×10^{11}	1.88×10^{11}
				2.3×10^{11}

TABLA 6.1: DATOS OBTENIDOS DE LAS FERMENTACIONES DE *B. thuringiensis* EN EL FERMENTADOR RB 14 A VELOCIDAD DE AIREACION CONSTANTE (1 VVM) Y DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACION.

FIG. 6.1 CARACTERIZACION BIOLÓGICA DEL
FERMENTADOR RB 14 A 1 VVM
Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*



**FIG. 6.2 PERFILES DE OXIGENO DISUELTO
FERMENTADOR RB 14 A 1 VVM
Bacillus thuringiensis var. *kurstaki***



VELOCIDAD DE AGITACION VARIABLE (RPM)

41.10 % a 700 y 800 RPM respectivamente en relación a la concentración obtenida a 500 RPM. De manera análoga, el tiempo de fermentación (definido como el tiempo transcurrido desde la inoculación del fermentador hasta que se alcanza un 90 % de esporulación) se abate un 28.2 % en el intervalo de 500 a 600 RPM y después ya no varía sensiblemente (tomando como base, tanto para X_E como para el tiempo de fermentación, el promedio obtenido a cada velocidad de agitación). Por lo tanto podemos concluir que la velocidad de agitación tiene efecto significativo sobre estos dos parámetros. Estos cambios son debidos principalmente al aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno, lo cual se corrobora con la fig. 6.1. Las desviaciones estandar para X_E , P_v y tiempo de fermentación a 800 RPM fueron 3.74×10^9 , 3×10^{10} y 2.29, respectivamente.

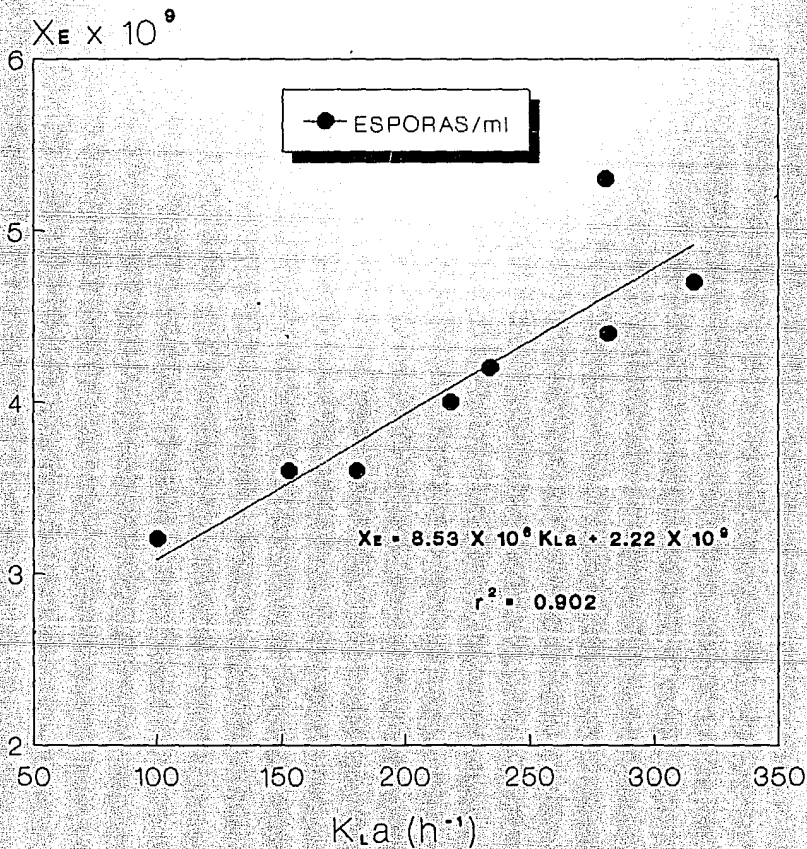
Una comparación de los perfiles de O.D. obtenidos de las fermentaciones efectuadas a diferentes velocidades de agitación se presenta en la fig. 6.2., de estos perfiles se revela claramente que en las fermentaciones a 500, 600, y 700 RPM el O.D. se encuentra abajo del 10 % de la concentración de saturación durante un largo periodo de tiempo. Con respecto a la fermentación a 800 RPM se presentan dos perfiles, los cuales llegan a estar abajo del 10 % de O.D. por un intervalo de una o dos horas, que comparado con las otras fermentaciones es mínimo. En base a estos resultados podemos considerar que las fermentaciones efectuadas a 800 RPM no se encuentran limitadas por oxígeno. Con respecto a los dos perfiles a 800 RPM, se observó que presentaron un comportamiento diferente a partir de la hora 13, que es cuando el

microorganismo está entrando a la fase de esporulación. Las diferencias presentadas por estos perfiles pudieran ser atribuidas a posibles problemas en la membrana del electrodo de O.D. despues de la hora 13.

RODA et al (1985) han indicado que la disponibilidad de oxígeno tiene un profundo efecto sobre los rendimientos de esporas y la actividad de la protoxina. DICKER Y FRENCH (1989) observaron que es necesario mantener el nivel de O.D. por arriba del 0.7 para tener un proceso de esporulación eficiente y una adecuada producción de protoxina. ANDERSON (1990) demostró que la producción de biomasa y protoxina estan correlacionadas a K_{La} por medio de una relación lineal. Este mismo efecto se encontró en el presente trabajo en el intervalo operado y se muestra en la fig. 6.3.

Los resultados de la figura 6.3 indican que la producción de esporas y por lo tanto, probablemente tambien la de protoxina (en nuestro caso consideramos, en base a experiencia que cada bacilo produce una espora y un cristal, y por lo tanto en el caldo cosechado tenemos una relación de espora:cristal de 1) están influenciadas por la disponibilidad de oxígeno en el medio. Es importante hacer notar que los resultados concuerdan con lo reportado por DULMAGE (1981) y LUTHY et al (1982) quienes sugieren que el crecimiento y esporulación de *B. thuringiensis* son maximizados por altos niveles de aireación. De la misma manera, los resultados de éste trabajo, junto con los de HOLMBERG et al (1980) y ANDERSON (1990), parecen indicar que solo bajo condiciones severas de limitación de oxígeno el crecimiento, la

FIGURA 6.3 X_E vs $K_L a$
FERMENTADOR RB 14
Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*



producción de protoxina y su actividad bioinsecticida son afectadas seriamente.

Como consecuencia del aumento en X_e y la disminución del tiempo de fermentación reportados en la tabla 6.1, se observó un aumento en la productividad (Pv), ya que ésta se elevó en 116.1 % de 500 a 800 RPM.

Los rendimientos de $Y_{x/s}$ en base a glucosa de acuerdo a la tabla 6.1, son mayores a los reportados por ARCAS et al (1984), quien obtuvo rendimientos de 0.2 a 0.22 g/g. Esta diferencia indicaría que la glucosa está siendo utilizada para síntesis de otros compuestos en mayor proporción bajo las condiciones de fermentación utilizadas por el grupo de Arcas que bajo las usadas por nosotros. ROWE (1990) ha reportado la acumulación de ácidos acético, láctico, pirúvico y poli- β -hidroxibutirato (PHB) principalmente.

Con respecto a la fig. 6.1, se observa que OTR y $K_L a$ se incrementan conforme se eleva la velocidad de agitación. La determinación se hizo hasta 800 RPM, que es la máxima velocidad de agitación que puede alcanzar el fermentador RB 14. De esto se desprende que a 800 RPM se tiene la máxima transferencia de oxígeno que se puede suministrar al sistema biológico bajo las condiciones de operación con el reactor empleado. Cabe aclarar que para elevar el valor de OTR se podrían incrementar la velocidad de aireación o Cl^* , mediante la utilización de aire enriquecido con O_2 o incrementando la presión de operación. La opción más viable es utilizar aire enriquecido con oxígeno, ya que si elevamos la velocidad de aireación el impulsor podría llegar a la condición de

inundación, con un consecuente decremento de OTR y el reactor no puede trabajar a una presión mayor a la atmosférica.

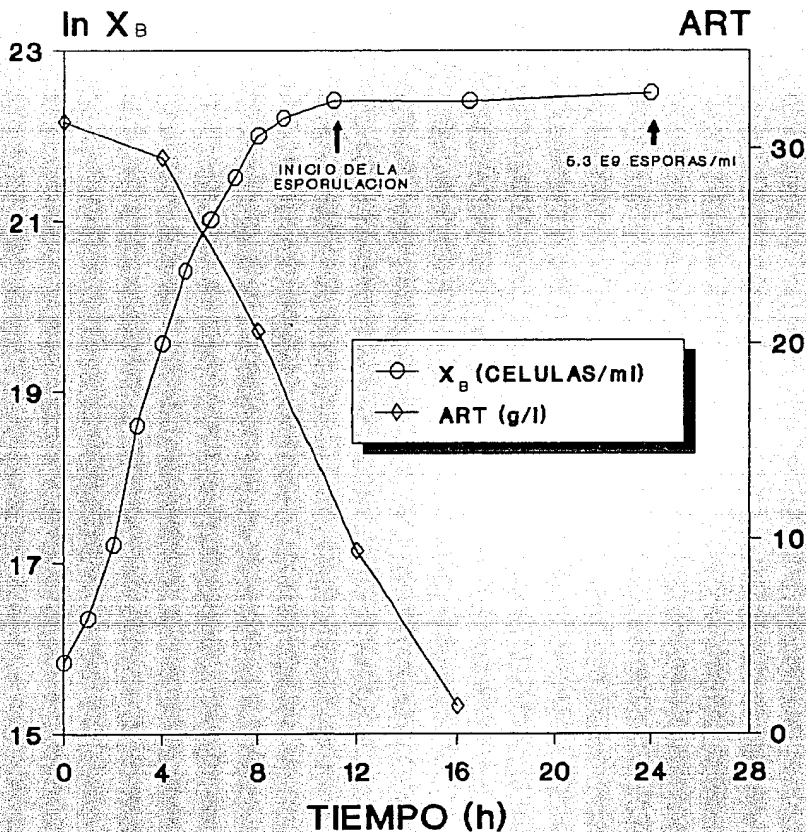
Puesto que se corroboró que X_r es función de KLa dentro del intervalo utilizado y se observó también una dependencia de P_v con respecto a KLa , se decidió utilizar ésta última u otra variable íntimamente relacionada como criterio de escalamiento. Dado que el reactor RN 1000 puede y debe operarse a presiones mayores a la atmosférica, los valores de Cl_2 en este reactor serían diferentes, por lo que el criterio de escalamiento escogido fué OTR. El OTR propuesto para el escalamiento fué de 1.75 g/l-h medido en el sistema biológico.

La velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ) a las condiciones de escalamiento, tiene un valor promedio de 0.7805 h^{-1} . En la fig. 6.4 se muestra una cinética de crecimiento típica a estas condiciones. Cabe aclarar que después del inicio de la esporulación el número de bacterias por ml se reporta como la suma de células lisadas y células no lisadas. Como ya se mencionó, la fermentación se detiene al alcanzar un 90 % de esporulación en el medio de fermentación. Este criterio se aplicó a todas las cinéticas de crecimiento.

El valor de μ obtenido es similar a lo reportado por otros autores. ARCAS et al. (1987) reporta una μ en el intervalo de $0.71-0.77 \text{ h}^{-1}$ y ANDERSON (1990) entre $0.6-1.1 \text{ h}^{-1}$.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados en la literatura (tabla 3.1), observamos que lo logrado en el fermentador RB 14 supera por mucho la productividad de los procesos fermentativos de *B. thuringiensis*.

FIG. 6.4 CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* EN EL FERMENTADOR RB 14 A 1 VVM Y 800 RPM.



6.2 CARACTERIZACION QUIMICA DEL FERMENTADOR RB 14.

La caracterización química se realizó con el fin de observar la relación existente entre el OTR biológico y el químico. Esto debido a que el escalamiento a planta piloto se hará con la hipótesis de que a un OTR determinado con el sistema biológico le corresponde un OTR con el sistema químico, bajo las mismas condiciones de agitación, aireación y temperatura. Por lo tanto, el determinar las condiciones a nivel piloto que nos den el mismo OTR químico que a nivel laboratorio, nos permitirá escalar el proceso a OTR constante. Los resultados se presentan en la tabla 6.2.

De ellos es evidente que en el rango manejado la agitación tiene mayor efecto sobre K_{La} y por lo tanto en OTR que la aireación. Estos resultados son acordes con lo reportado por IMAI (1997) para fermentadores de laboratorio (5 l) que encontró que:

$$K_{La} = \kappa N^{2.48} v_g^{0.74} \dots\dots\dots(6.1)$$

Donde κ es una constante de proporcionalidad, N es la velocidad de agitación en s^{-1} y v_g es la velocidad superficial del gas en m/s .

6.3 CARACTERIZACION DEL FERMENTADOR RB 14 POR EL METODO DE ALIMENTACION DE SULFITO DE SODIO.

Referente a la caracterización para K_{La} de fermentadores de

RPM	VVM	K _{1a} (h ⁻¹)	OTR (g O ₂ /l h)
400		69.11	0.413
500		139.02	0.832
600	0.8	246.27	1.474
700		341.60	2.044
800		476.66	2.852
400		89.37	0.535
500		188.68	1.129
600	1.0	287.98	1.723
700		407.15	2.436
800		566.03	3.387

TABLA 6.2: RESULTADOS DE LA CARACTERIZACION PARA K_{1a} Y OTR DEL FERMENTADOR RB 14 EMPLEANDO EL METODO DEL BALANCE CON SULFITO DE SODIO.

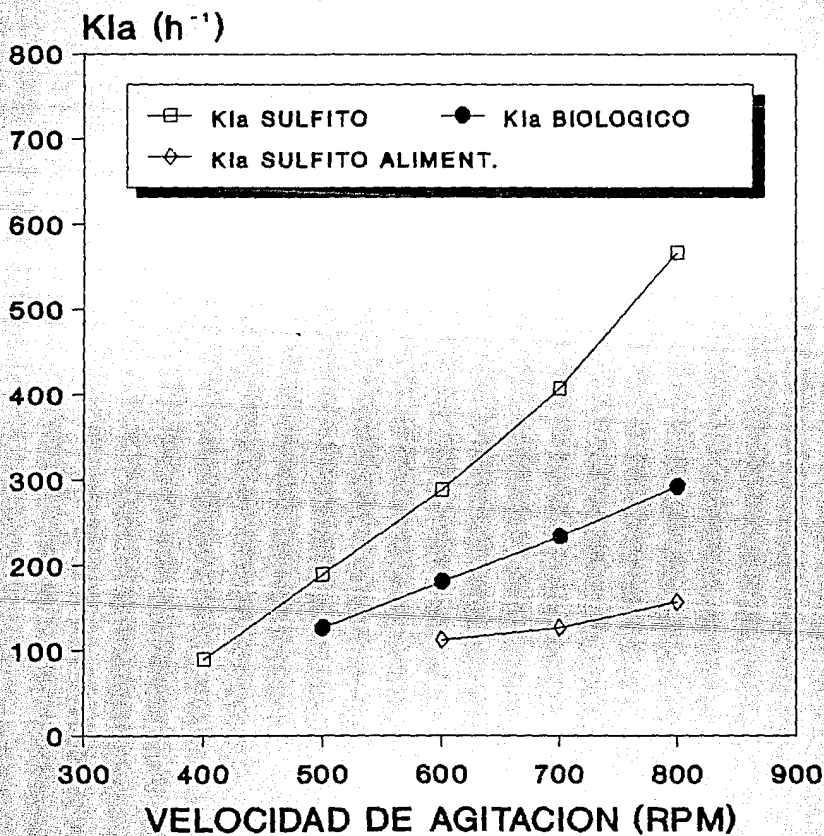
laboratorio e industriales, se encontró reportado en la literatura por IMAI et al (1987) un nuevo método para determinar $K_L a$ por medio de la alimentación de sulfito de sodio. Este método presenta las siguientes ventajas:

- Es un método de estado estacionario.
- Debido a la baja cantidad de sulfito de sodio acumulado, se puede aplicar a sistemas libres de electrólito.
- El agua residual se puede descargar directamente al drenaje sin necesidad de tratamiento, debido a la baja concentración de sales.
- El método es económico debido a la baja concentración de sales que usa.

Por lo anterior se decidió montar la técnica, ya que se consideró que podría dar valores de $K_L a$ similares o más aproximados al $K_L a$ biológico, en comparación con el $K_L a$ del sistema químico; porque al ser un sistema con pocas sales, su coalescencia podría ser similar a la del sistema biológico. En la fig. 6.5 se presentan los resultados obtenidos con este método y una comparación de los valores promedio de los $K_L a$ biológico y sulfito a velocidad de aireación constante.

De estos resultados se observa que los datos obtenidos se encuentran muy por abajo del $K_L a$ biológico y del sulfito, siendo comparables a los datos reportados por ROBINSON Y WILKE (1972) para agua destilada. Estos autores reportan valores de $K_L a$ para varias soluciones de electrólito, los cuales fueron

FIG. 6.5 K_{La} EN FUNCION DE AGITACION
EN EL FERMENTADOR RB 14
A 1 VVM



apreciablemente mayores que los obtenidos en agua destilada. Observaron además que la magnitud de las diferencias se incrementa con el aumento de P_0/V . El $K_L a$ para soluciones de electrólito tiene valores del orden de 1200 h^{-1} , mientras que en agua destilada es de solo 200 h^{-1} , diferenciando por un factor de 6.

En base a estos resultados se decidió desechar esta técnica, porque para adaptarla a nuestro sistema, se tendrían que simular medios de fermentación con distintas concentraciones de sales, hasta encontrar uno que nos simulara la coalescencia del medio de fermentación que se maneja, lo que queda fuera del objetivo del presente trabajo.

6.4 ADECUACION Y ARRANQUE DEL FERMENTADOR RN 1000.

Con el objeto de dejar en óptimas condiciones el fermentador RN 1000, se efectuaron las siguientes actividades:

6.4.1 DISEÑO Y CONSTRUCCION DEL SISTEMA DE AGITACION.

Se diseñó y construyó un nuevo sistema de agitación (turbinas y flecha), debido a que el sistema anterior tenía un peso muerto de 70 kg, lo cual se traducía en un alto gasto de energía del motor y en problemas para efectuar el mantenimiento preventivo de los sellos mecánicos. Además, el diámetro de las turbinas era de 0.4005 m, lo que daba una relación $D_i/D = 0.5$.

VARDAR-SUKAN (1969) ha observado que la velocidad de transferencia de oxígeno a una potencia dada es dependiente de la

relación D_i/D . Encontró que impulsores pequeños ($D_i/D = 0.23$) dan un OTR ocho veces mayor que con impulsores grandes ($D_i/D = 0.6$) a la misma potencia. De manera contraria, impulsores grandes presentan alta capacidad de bombeo (ND_i^3) y crean una distribución de oxígeno más uniforme a través del fermentador, mientras que impulsores pequeños causan una turbulencia local alta e incrementan OTR.

En base a esta revisión se decidió que las nuevas turbinas mantuvieran una relación estandar con relación al tanque, de tal forma que $D_i/D = 0.33$, de acuerdo a AIBA et al (1973), OLDSHUE (1983) y MIDOUX Y CHARPENTIER (1984). En la tabla 6.3 se presentan las características de la flecha y de los impulsores correspondientes al nuevo diseño.

Respecto a la distribución de impulsores en la flecha del sistema de agitación, OLDSHUE (1983) indica que el primer impulsor es el que controla la dispersión gas-líquido y el KLa. Sugiere que el primer impulsor esté a una distancia D_i del fondo del tanque, y que de ser necesarios más impulsores éstos sean colocados de tal manera que se obtengan otros beneficios, tal como la suspensión de sólidos, mejor mezclado o tener una transferencia de oxígeno aun más efectiva. A su vez, HUDCOVA et al (1989) recomienda utilizar distancias entre impulsores de 2 a 3 D_i en sistemas con relaciones $H_L/D_i \geq 2$. Así mismo indica que tal espaciamiento maximiza la potencia suministrada y aumenta el potencial para la transferencia de oxígeno.

En nuestro caso la distribución de impulsores quedó de la siguiente manera:

D:	26.70 cm
L:	6.67 cm
W:	5.34 cm
Ø DISCO	17.78 cm
Ø FLECHA	3.81 cm
LONGITUD DE LA FLECHA	215.00 cm
PESO IMPULSOR	4.50 kg
PESO FLECHA	20.50 kg

TABLA 6.3: CARACTERISTICAS GEOMETRICAS DE LA FLECHA
E IMPULSORES DEL FERMENTADOR RN 1000.

- Distancia del fondo del tanque al primer impulsor D_1 .
- Distancia del primer al segundo impulsor $1.5 D_1$.

Con respecto a la distancia del primer al segundo impulsor, se decidió no aplicar lo recomendado por HUDCOVA et al (1989), ya que el fermentador RN 1000 tiene una relación $H_L/D = 1.87$, y el medio de cultivo presenta una cantidad considerable de sólidos en suspensión (14.9 - 22.5 g/l; VILLAFANA, 1990), por lo cual se pensó que con la distribución ya descrita se evitaría la sedimentación de tales sólidos.

6.4.2 ANILLO DIFUSOR.

El anillo difusor se tuvo que rediseñar de acuerdo al nuevo tamaño de impulsor.

OLDSHUE (1989) indica que la relación óptima de D_s a D_1 para maximizar la transferencia de masa es de 0.8; recomienda además, que los diámetros de orificio sean de 2 a 5 mm y que la distancia del anillo difusor al primer impulsor sea de $0.25 D_1$.

OLDSHUE Y CONNOLLY (1977) han investigado el efecto de D_s , desde $D_s = D_1$ hasta $D_s = 1.5 D_1$, sobre la transferencia de masa a P_0 constante. Ellos sugieren que la eficiencia de la transferencia de masa decrece con el aumento de la relación D_s/D_1 . Sin embargo, NIENOW et al (1980) mencionan que trabajando con anillos difusores grandes ($D_s = 1.2 D_1$), a la misma velocidad de agitación y aireación que la utilizada por OLDSHUE Y CONNOLLY (1977), obtienen más consumo de potencia y por lo tanto, mayores valores de $K_L a$.

A su vez, MARTINEZ et al (1989) han demostrado que la

influencia de la posición del difusor sobre $K_L a$ es más evidente conforme se incrementa la escala. Para maximizar la transferencia de masa sugieren que el difusor esté colocado lo más cerca posible, debajo de las paletas o álabes del impulsor. Esto evitará la coalescencia de las burbujas y las inducirá a entrar a zona de baja presión donde serán dispersadas.

En base a lo anterior el nuevo anillo difusor tiene una relación $D_s/D_v = 0.8$ y la distancia entre el difusor y el primer impulsor es de $0.25 D_v$. En contraparte, se decidió mantener el mismo número y diámetro de orificios, los cuales fueron 29 y 2mm respectivamente. Esto en base a que el diámetro nominal del difusor era el mismo (tubo 1" CED 40 S 304) y a que el perímetro del nuevo difusor era ligeramente menor.

6.5 CARACTERIZACION DEL FERMENTADOR RN 1000 Y ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACION PARA EL ESCALAMIENTO.

Para la caracterización química del reactor se estudió un intervalo de velocidades de aireación (0.2-0.8 VVM) y velocidades de agitación (100-500 RPM). Los resultados para $K_L a$ se presentan en la fig. 6.6 y en la fig. 6.7 los de OTR, ambos se comparan con los resultados de caracterización del fermentador RB 14. Los perfiles obtenidos en tales figuras eran esperados de acuerdo a lo reportado en la literatura y mas bien se está comprobando este comportamiento.

A los resultados de caracterización del fermentador RN 1000

FIG. 6.6 K_La EN FUNCION DE VELOCIDAD DE AGITACION EN EL FERMENTADOR RN 1000 Y RB 14.

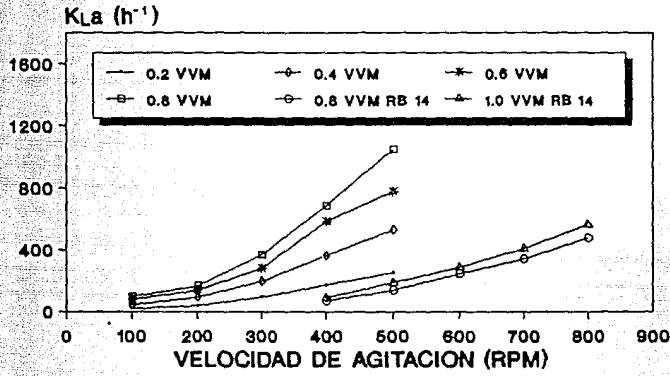
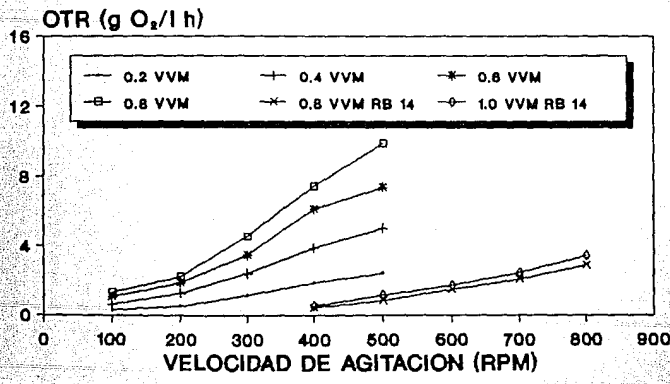


FIG. 6.7 OTR EN FUNCION DE VELOCIDAD DE AGITACION EN EL FERMENTADOR RN 1000 Y RB 14.



se les efectuó una regresión no-lineal, ajustándose al siguiente modelo:

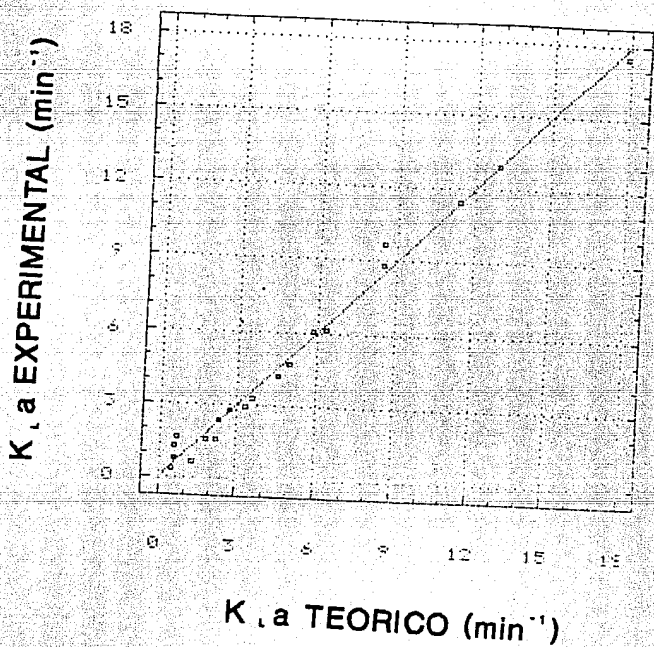
$$KLa = 0.238 N^{1.72} V_s^{0.276} \dots \dots \dots (6.2)$$

Donde N en s^{-1} , V_s en $cm s^{-1}$ y KLa en min^{-1} . En la fig. 6.8 se presenta la relación entre el KLa experimental y el modelo.

Comparando los resultados para KLa del fermentador RN 1000 con respecto a lo existente en la literatura, concluimos que nuestros datos están en el mismo orden de magnitud que los reportados por otros autores. MORESI Y PATETE (1988) reportan para un fermentador de 970 l de volumen de operación un KLa de $1091 h^{-1}$, determinado por el método del sulfito tradicional a 720 RPM y 0.63 VVM.

Efectuando una comparación de OTR en los fermentadores RB 14 y RN 1000, se observa que a KLa iguales no corresponden OTR semejantes. En el RB 14 con un KLa de $560 h^{-1}$ se tiene un OTR de 3.38 g/l-h, mientras que en el RN 1000 a un KLa de $582 h^{-1}$ se obtiene un OTR de 6.045 g/l-h. Este efecto es debido a la diferencia en la presión absoluta de trabajo de ambos fermentadores, que afecta el valor de C^* (ley de Henry, ec. A.13). Así, mientras el RB opera a presión atmosférica con una C^* de 0.187 mmol/l (agua a 30°C), el RN 1000 trabaja a 1.85 atm absolutas y una C^* de 0.4543 mmol/l (agua a 30°C). Por lo tanto las diferencias en OTR entre ambos fermentadores son casi del 100%. Por tal razón, como ya se mencionó anteriormente, el criterio de escalamiento seleccionado fué OTR.

FIG. 6.8 RELACION ENTRE EL K_{La} EXPERIMENTAL Y EL K_{La} TEORICO
RN 1000



Ahora bien, en base a los resultados obtenidos en el fermentador RB 14 se determinó un OTR de escalamiento en base al sulfito de 3.387 g/l-h. Tomando en cuenta los resultados de caracterización del fermentador RN 1000, se propusieron unas condiciones de operación iniciales para el proceso a nivel planta piloto de 350 RPM y 0.4 VVM, ya que a estas condiciones se alcanza el valor de OTR seleccionado.

Vale la pena aclarar que no se contó con un método para la medición de P_o/V de manera confiable, por lo que no se probó ninguno de los modelos reportados en la literatura (modelos del tipo de la ec. 3.11). Además, tales modelos son poco confiables ya que presentan errores promedio de 17.5 a 57.9 % (MORESI Y PATETE, 1988) o bien son exactos en un 20 a 40 % (VAN T RIET, 1979). Por lo tanto el calcular P_o/V con alguno de los modelos reportados produciría un valor con un alto grado de incertidumbre, ya que no habría manera de saber que tan alejado estaría del valor real.

6.6 ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE FERMENTACION DE *Bacillus thuringiensis* EN EL FERMENTADOR RN 1000.

Una vez efectuada la caracterización, se procedió al escalamiento del proceso a OTR constante. Se corrieron en total cuatro fermentaciones, dos a las condiciones de operación determinadas en el punto 6.5 y dos a diferentes condiciones de transferencia de oxígeno con el fin de observar el comportamiento de P_v con respecto a OTR. Los resultados se presentan en la tabla

6.4 y una cinética de crecimiento típica en la figura 6.9. Cabe aclarar que OTR no se determinó por medio del método del balance, debido a fallas en el equipo de medición de O.D.. Como alternativa se empleó el método descrito por COONEY (1981) (c. A.15) para la medición de OUR y se igualó a OTR. Esto es posible cuando la demanda de oxígeno del sistema biológico se iguala a la transferencia de oxígeno del fermentador, si se asume que $Cl \approx 0$ se tiene la máxima transferencia que puede ser suministrada por el fermentador a las condiciones particulares, de tal forma el KLa del sistema puede ser determinado a condiciones definidas de OTR (KAPPELI Y FIECHTER, 1980; KAPPELI Y FIECHTER, 1981; FIECHTER Y ADLER, 1983).

De la tabla 6.4 se observa que en un intervalo de 350 a 380 RPM y 0.3 a 0.4 VVM, el OTR y la productividad del proceso permanecen prácticamente constantes. En la repetición de la fermentación a 350 RPM y 0.4 VVM no se determinó OTR debido a que no se contó con los equipos para medición de O_2 y CO_2 en fase gas.

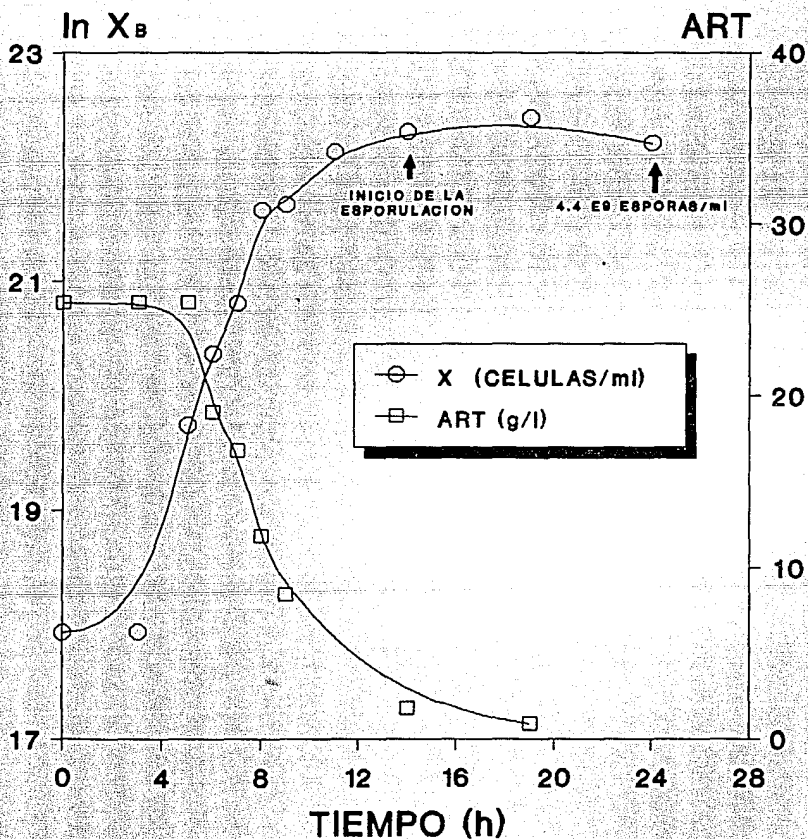
La fermentación efectuada a 300 RPM y 0.3 VVM presentó valores de OTR y tiempo de fermentación más bajos. Esto es claro debido a que las condiciones de operación estuvieron por abajo de las que soportan un OTR_0 de 1.75 g/l-h. Sin embargo, la concentración de esporas X_e obtenida a estas condiciones fue alta, lo cual se tradujo en que la productividad fuera constante con respecto a lo obtenido en los demás experimentos a nivel piloto. Las posibles causas de este efecto son desconocidas.

En la tabla 6.5 se comparan los resultados promedio obtenidos en los reactores RB 14 y RN 1000 al valor de OTR seleccionado para

TABLA 6.4: RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS FERMENTACIONES DE *Bacillus thuringiensis* EN EL FERMENTADOR RN 1000.

0.3 VVM	0.4 VVM	0.3 VVM
300 RPM	350 RPM	380 RPM
<p>OTR = 1.28 g/l-h $X_E = 5.35 \times 10^9$ ESP/ml $\mu = 0.608 \text{ h}^{-1}$ $P_v = 2.06 \times 10^{11}$ ESP/l-h $Y_{x/s} = 0.415 \text{ g/g}$ T. FERM = 26 h</p>	<p>OTR = 1.725 g/l-h $X_E = 4.40 \times 10^9$ ESP/ml $\mu = 0.633 \text{ h}^{-1}$ $P_v = 2.100 \times 10^{11}$ ESP/l-h $Y_{x/s} = 0.406 \text{ g/g}$ T. FERM = 21 h</p>	<p>OTR = 1.709 g/l-h $X_E = 4.2 \times 10^9$ ESP/ml $\mu = 0.679 \text{ h}^{-1}$ $P_v = 2.1 \times 10^{11}$ ESP/l-h $Y_{x/s} = 0.326 \text{ g/g}$ T. FERM = 20 h</p>
	<p>$X_E = 5.75 \times 10^9$ ESP/ml $\mu = 0.7058 \text{ h}^{-1}$ $P_v = 2.300 \times 10^{11}$ ESP/l-h T. FERM = 25 h</p>	

FIG. 6.9 CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* EN EL FERMENTADOR RN 1000 A 0.4 VVM Y 350 RPM



el escalamiento (OTR = 1.75 g/l-h determinado con el sistema biológico). En ella se observa que X_E fué prácticamente la misma para ambos fermentadores, mientras que el tiempo de fermentación y μ fueron 10 y 16 % menores en el RN 1000, en tanto que $Y_{x/s}$ y P_v se incrementaron en 14 y 17 %.

La disminución de μ a las condiciones de escalamiento en el RN 1000, pudo deberse a la presencia de gradientes en el fermentador. BYLINKINA Y BIRUKOV (1972); SWEERE et al (1987) y ONKEN Y LIEFKE (1989), indican que el escalamiento de procesos de fermentación a menudo es acompañado por caídas en los rendimientos y en μ , causados por gradientes de temperatura, concentración de sustrato, CO_2 y oxígeno disuelto, debido a un mezclado insuficiente. Este efecto de caída de μ también fué observado por HOLMBERG et al (1980), quienes reportaron una reducción de μ de 1.3-1.4 h^{-1} a 0.95 h^{-1} cuando escalaron el proceso de 8 a 1000 l (volumen de operación).

El incremento de $Y_{x/s}$ en base a glucosa podría deberse a una disminución del flujo de azúcar canalizado a la síntesis de otros metabolitos (ácido acético, ácido láctico, PHB, etc.) como reporta ROVE (1990) y/o a la mayor disponibilidad de los aminoácidos del medio de cultivo, debido a una hidrólisis más efectiva de la HS y de la LC. Para las fermentaciones realizadas en el RN 1000 la hidrólisis se hizo en el mismo fermentador, con agitación mecánica, mientras que en el RB 14 se llevó a efecto sin agitación mecánica. VILLAFARA (1990) observó que la concentración de sólidos suspendidos en el medio de cultivo disminuía drásticamente, si la hidrólisis se efectuaba bajo agitación mecánica, debido

TABLA 6.5. RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES DE *Bacillus luringiensis* A LAS CONDICIONES DE ESCALAMIENTO.

	RB 14	RN 1000
XE (ESPORAS/ml)	4.8×10^9	5.08×10^9
Yx/s (g/g glucosa)	0.355	0.406
OTR (g/l-h)	1.75	1.725
Pv (ESPORAS/l-h)	1.88×10^{11}	2.207×10^{11}
μ (h ⁻¹)	0.7805	0.67
T. FERM. (h)	25.5	23

probablemente a una mayor solubilización de los nutrientes.

El aumento en P_v se explica básicamente por la disminución del tiempo total de fermentación, ya que la concentración de esporas fue prácticamente la misma. La disminución del tiempo de fermentación puede atribuirse a una mayor disponibilidad de aminoácidos del medio por el microorganismo, lo cual podría ser causa de una sincronización del proceso de esporulación, y por lo tanto en una reducción del tiempo de esporulación global, ya que el valor de μ disminuyó al cambiar la escala de la fermentación.

En la fig. 6.10 se presenta el perfil de P_v con respecto a OTR biológico, obtenido en el fermentador RB 14 y las productividades obtenidas en el fermentador RN 1000. A los datos de productividad del RB 14 se les aplicó un tratamiento estadístico empleando el programa "SYSTAT"® con el fin de ajustarlos a un modelo de 2° orden. El resultado es:

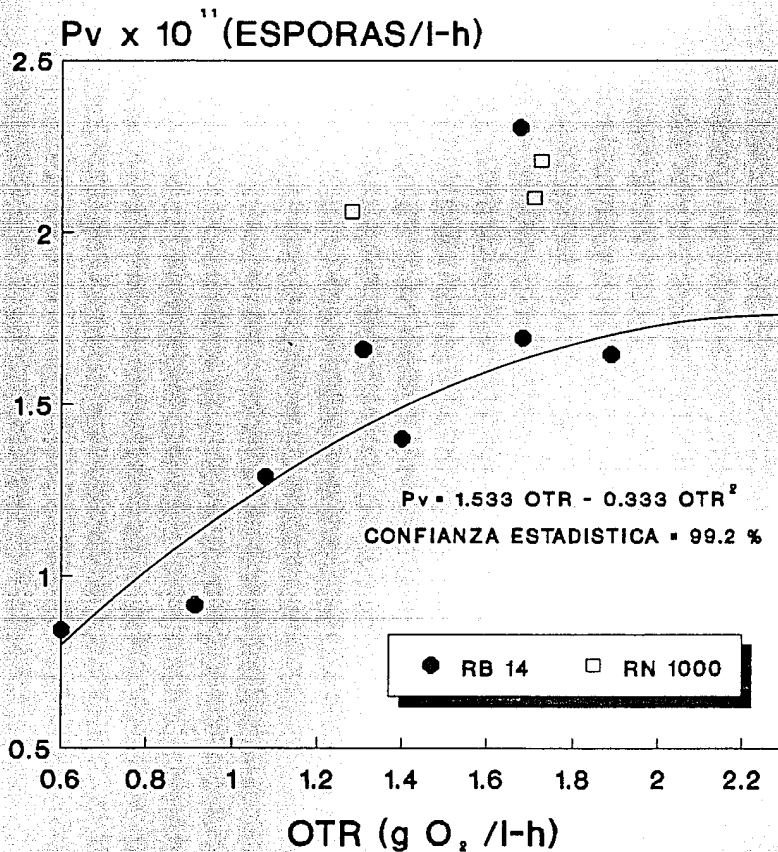
$$P_v (\times 10^{11}) = 1.533 \text{ OTR} - 0.333 \text{ OTR}^2 \dots\dots (6.3)$$

El modelo tiene una confianza estadística de 99.2 % e indicó que el punto con OTR de 1.677 g/l-h y P_v de 2.304×10^{11} esporas/l-h no es confiable estadísticamente, por lo tanto se eliminó para el ajuste.

En base al modelo obtenido se determinó que P_v es constante a partir de OTR = 2.3 g/l-h e igual a 1.76×10^{11} esporas/l-h. Por lo tanto, en base al modelo, para el escalamiento se debe de considerar que el punto óptimo de escalamiento es a OTR de 2.3 g/l-h que equivale a un OTR químico = 4.45 g/l-h, ya que según

FIG. 6.10 PRODUCTIVIDAD EN FUNCION DE OTR.

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*



AIBA et al (1973) la región efectiva de escalamiento es el punto donde la productividad permanece constante.

Los resultados obtenidos son insuficientes para establecer de forma definitiva que OTR es un criterio de escalamiento adecuado, sin embargo parece ser que podría ser utilizado. Para confirmar del todo esta aseveración se tendrían que efectuar experimentos en ambos fermentadores a un OTR de 2.3 g/l-h, con el medio de cultivo hidrolizado bajo las mismas condiciones que a nivel piloto para eliminar los posibles efectos por preparación del medio. El desarrollo de estos experimentos formaría parte de otro trabajo experimental.

6.7 COMPARACION DE OTR EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICO Y QUÍMICO.

Una retrospectiva a los resultados obtenidos nos indica que la hipótesis propuesta en la sección 6.2, de que a un OTR con un sistema biológico le corresponde un OTR con un sistema químico para diferentes escalas de fermentación fue correcta. Los resultados se presentan en la tabla 6.6.

La comparación de estos resultados nos llevó a concluir que, en base a que los resultados son semejantes, la hipótesis propuesta se cumplió para la escala probada y por lo tanto podría ser una herramienta útil para el escalamiento de procesos de fermentación con fluidos newtonianos.

OTR	BIOLOGICO	QUIMICO
RB 14	1.08	1.723
	1.75	3.387
RN 1000	1.20	1.750
	1.72	3.300

**TABLA 6.6: COMPARACION DE OTR EN LOS SISTEMAS
BIOLOGICO Y QUIMICO.**

6.8 BIOENSAYOS PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD DEL BIOINSECTICIDA PRODUCIDO.

Los bioensayos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Jorge Ibarra, ubicado en el CINVESTAV-Irapuato por personal a su cargo, empleando el sistema computacional de análisis PROBIT.

Se utilizó el lote producido a 380 RPM y 0.3 VVM, previo secado por aspersión del mosto fermentado. Se corrió un bioensayo con su repetición, tomándose dos muestras aleatorias del mismo lote. El insecto prueba fue *Manduca sexta* (gusano del cuerno del tabaco), los resultados se presentan en la tabla 6.7 en conjunto con el estandar.

De estos resultados se aprecia que la toxicidad del bioinsecticida es bastante aceptable, sobre todo si se toma en cuenta que nuestro bioinsecticida está compuesto de esporas, cristales y sólidos de fermentación, mientras que el estandar esta compuesto exclusivamente del complejo espора-cristal.

Las diferencias en CL_{50} reportadas en el bioensayo se atribuyeron a problemas de homogeneidad de la suspensión del bioinsecticida, ya que no fué formulado.

TABLA 6.7: RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS EFECTUADOS CON EL BIOINSECTICIDA PRODUCIDO EN EL ESCALAMIENTO.

INSECTO-BLANCO Manduca sexta	REPETICION	CL ₅₀ ² ng/cm ²
B. thuringiensis (HD-1) [*] ESTANDAR ^a	1	64.492
	2	53.394
	3	82.007
	X	66.630
B. thuringiensis (HD-73) [*]	1	89.550
	2	242.953
	X	166.250

* VAR. kurstaki

^a COMPLEJO ESPORA-CRISTAL PURIFICADO

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

7.1 CONCLUSIONES.

Las conclusiones más relevantes del proyecto de investigación realizado se enlistan a continuación:

A) Se determinó que operando la fermentación de *B. thuringiensis* bajo condiciones que no presenten limitación de oxígeno aumenta μ y se reducen el tiempo de esporulación y de lisis celular.

B) Se concluyó que a un OTRs le corresponde un OTRs para el mismo sistema de fermentación (medio de cultivo, microorganismo, pH, etc.) y diferentes fermentadores, por lo tanto ésta podría ser una herramienta útil para el escalamiento de procesos de fermentación con fluidos newtonianos.

C) Aparentemente OTR es el criterio de escalamiento adecuado. Sin embargo tendrá que corroborarse posteriormente efectuando experimentos a nivel de laboratorio y en el RN 1000 a OTRs de 2.3 g/l-h, con el medio de cultivo hidrolizado bajo las mismas condiciones que a nivel piloto, para eliminar los posibles efectos por preparación del medio.

D) El proceso de fermentación podría ser escalable a nivel industrial, ya que en teoría operaría, en base al modelo, a un OTR de 2.3 g/l-h, que son condiciones de transferencia de masa que se encuentran dentro del intervalo de operación de fermentadores

industriales que presentan OTR entre 0.57 y 7.2 g/l-h (CHARLES, 1985). Esto siempre y cuando se confirmara que el proceso esta gobernado por OTR.

E) La actividad bioinsecticida del producto obtenido es similar al estandar utilizado.

7.2 RECOMENDACIONES.

Las recomendaciones aquí propuestas, son tendientes a marcar la dirección de investigaciones futuras dentro del mismo proyecto:

A) Efectuar experimentos a un OTR₀ de 2.3 g/l-h tanto a nivel de laboratorio como a planta piloto, para corroborar que la productividad del proceso ya es independiente de OTR a partir de éste punto. Los experimentos a nivel laboratorio deberán de realizarse con el medio de cultivo hidrolizado bajo las mismas condiciones que a nivel piloto, para eliminar los posibles efectos por preparación del medio.

B) Diseñar sistemas que operen en cultivo por lote alimentado o cultivo continuo (compuesto de dos tanques, el primero para producción y el segundo para esporulación), ya que se ha demostrado en la literatura que el operar bajo estos regimenes, aumenta la productividad y los rendimientos de los procesos.

C) Optimizar el proceso de fermentación por lote (medio de cultivo, condiciones de operación, preparación de materias primas y esterilización) tendiente a minimizar costos.

sin detrimento de la productividad y de la actividad bioinsecticida del producto.

D) Montar técnicas más avanzadas para cuantificar la evolución de la actividad del bioinsecticida (p.e. ELISA), durante el proceso fermentativo. Esto con el fin de dar por terminado el proceso por lote al momento de alcanzar la actividad más alta de bioinsecticida.

E) Elaborar un análisis económico del proceso para determinar los costos de producción del bioinsecticida.

F) Establecer convenios de colaboración con las instituciones adecuadas, para efectuar pruebas y cuantificar la actividad del bioinsecticida en campo.

8. BIBLIOGRAFIA.

Aiba S., Humphrey A.E. y Millis N.F. (1973). *Biochemical Engineering*. 2nd ed., Academic Press Inc., New York.

Anderson B.T. (1990). Effects of carbon:nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield bioinsecticidal crystal protein. M.Sc. Thesis. The University of Western Ontario, Canada.

Arcas J. (1985). Producción de Bioinsecticidas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Arcas J., Yantorno O., Arraras E. y Ertola R. (1984). A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* 6, 495-500.

Arcas J., Yantorno O. y Ertola R. (1985). Production of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by batch and fed-batch cultures. 7th. GIAM Conference, Helsinki, Finlandia.

Arcas J., Yantorno O. y Ertola R. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnol. Lett.* 9, 105-110.

Aronson A.I., Beckman N. y Dunn P. (1986). *Bacillus thuringiensis*

and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.

Bandyopadhyay B., Humphrey A.E. y Taguchi H. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* 9, 533-544.

Bird R.B., Stewart W.E. y Lightfoot E.N. (1960). *Transport Phenomena*. Wiley & Sons, New York.

Bjurstrom E. (1985). *Biotechnology*. *Chem. Eng.* 92(4), 126-158.

Blakebrough N. y Moresi M. (1981). Scale-up of whey fermentation in a pilot-scale fermenter. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 173-178.

Brauer H. (1985). Stirred vessel reactors. En: *Biotechnology*, Rehm H.J. y Reed G. eds., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2, 395-394.

Brauer H. (1987). Development and efficiency of a new generation of bioreactors, Part I. *Bioprocess Eng.* 2, 149-159.

Brousseau R. y Masson L. (1988). *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins: gene structure and mode of action. *Biotech. Adv.* 6, 697-724.

Bulla L.A., Brechtel D.B., Kramer K.J., Shethna Y.I., Aronson A.I.

y Fritz-James P.C. (1980). Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Microbiol. 8, 147-204.

Burgerjon A. y Martouret D. (1971). Determination and significance of the host spectrum of *Bacillus thuringiensis*. En: Microbial Control of Insects And Mites, Burges H.D. y Hussey N.W. eds., Academic Press, 305-325.

Bylinkina E. y Birukov V.V. (1972). The problem of scale-up in antibiotic biosynthesis. PROC. IV IFS: Ferment. Technol. Today, 105-115.

Cahue A. (1990). Comunicación personal.

Charles M. (1985a). Fermenter design and scale-up. En: Comprehensive Biotechnology, Murray Moo-Young ed., Pergamon Press, England, 2, 57-75.

Charles M. (1985b). Fermentation scale-up: Problems and Possibilities. *ribtech* 3(6), 134-138.

Cooney C.L. (1981). Growth of microorganisms. En: Biotechnology, Microbial Fundamentals, Rehm H.J. y Reed G., Verlag-Chemie, 1, 73-113.

Couch T.L. y Ross D.A. (1980). Production and utilization of

Bacillus thuringiensis. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1297-1304.

De Urquijo N.E. (1987). Producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de ciertas plagas agrícolas y médicas de importancia en México. Tesis de Maestría. Cinvestav-IPN. México.

Dicker H.J. y French E.J. (1989). Improved, higher yield media and alternate nitrogen sources for the production of crystal protein by *Bacillus thuringiensis*. Resumen de The Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, Laval, Quebec, Junio.

Dulmage T.H. (1981). Production of bacteria for biological control of insects. En: *Biological Control of Crop Production*, Papavizas G.C. ed., *Beltsville Symposia in Agricultural Research*, Allanheld, Osmun and Co., Totowa N.J., 5, 129.

Dulmage T.H. y Rhodes R.A. (1971). Production of Pathogens in artificial media. En: *Microbial Control of Insects and Mites*, Burges H.D. y Hussey N.W. eds., Academic Press, 507-538.

Einsele A. (1976). Scaling up of bioreactors theory and reality. 5th International Fermentation Symposium, Berlin.

Einsele A. (1978). Scaling-up bioreactors. *Process Biochem.* 13, 13-14.

Egorov N.S., Loriya Zh.K. y Yodina T.G. (1984). Influence of

- aminoacids of the synthesis of exoproteasa by *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 19, 481.
- Ertola R. (1987). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. En: Horizons of Biochemical Engineering, Suichi Aiba ed., University of Tokio Press, 187-199.
- Fast P.G. (1981). The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. En: Microbial Control of Pest and Plant Diseases, 1970-1980, Burges H.D. ed., Academic Press London, 223-248.
- Fiechter A. y Adler I. (1983). Performance of new bioreactor designs. *Rev. Biol.* 76, 297-312.
- Flickinger M.C., Greenstein M., Bremon C. y Conlin J. (1990). Strain selection, medium development and scale-up of toyocamycin production by *Streptomyces chrestomyceticus*. *Bioprocess Eng.* 5, 143-153.
- Fuchs R., Ryu D.D.Y. y Humphrey A.E. (1971). Effect of surface aeration on scale-up procedures for fermentation processes. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop.* 10, 190-196.
- Goldberg I., Sneh B., Battat E. y Klein D. (1980). Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. *Biotechnol. Lett.* 2,

419-426.

Holmberg A., Sievanen R. y Carlberg G. (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. *Biotechnol Bioeng.* 22, 1707-1724.

Hudcova V., Nienow A.W., Haozhung W. y Huoxing L. (1987). On the effect of liquid height on the flooding/loading transition. *Chem. Eng. Sc.* 42, 375-377.

Imai Y., Takei H. y Matsumura M. (1987). A simple Na_2SO_3 feeding method for $K_L a$ measurement in large-scale fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 982-993.

Insell J.P. (1983). Studies on the structure and origin of the parasporal inclusion of the sporulating bacilli. Ph. D. Thesis, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

Jain D. y Buckland B.C. (1988). Scale-up of the efrotomycin fermentation using a computer-controlled pilot plant. *Bioprocess Eng.* 3, 31-36.

Jarai M. (1972). Origen transfer in the fermentations of primary and secondary metabolites. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today*, 97-103.

Joshi J.B., Pandit A.B. y Sharma M.M. (1982). Mechanically

agitated gas-liquid reactors. *Chem. Eng. Sc.* 37, 813-844.

Kappeli O. y Fiechter A. (1980). Biological method for the measurement of the maximum oxygen transfer rate of a bioreactor at definite conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1509-1512.

Kappeli O. y Fiechter A. (1981). On the methodology of oxygen transfer coefficient measurements. *Biotechnol. Lett.* 3, 541-546.

Kargi F. y Moo-Young M. (1984). Transport phenomena in bioprocess. En: *Comprehensive Biotechnology*, Murray Moo-Young ed., Pergamon Press, 2, 5-56.

Karow E.O., Bartholomew W.H. y Sfat M.R. (1953). Oxygen transfer and agitation in submerged fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 1, 302-306.

Kaszab I. Hogye I., Komocsi S. y Szilagyi J. (1981). Possible side effect of scale-up: Extra cellular accumulation of asparagine in tobramycin fermentation. *Process Biochem.* 49, 38-39.

Kenney D.S. y Couch T.L. (1981). Biological Control in Crop production. *Beltsville Symposia in Agricultural Research*, 5, 161-180.

Khachatourians G.G. (1986). Production and use of biological pest control agents. *Tibtech* 4, 120-124.

Khang S.J. y Levenspiel O. (1976). New scale-up and design method for stirrer agitated batch mixing vessels. *Chem. Eng. Sc.* 31, 569-577.

Kossen N.W.F. y Oosterhuis N.M.G. (1985). Modelling and scaling-up of bioreactors. En: *Biotechnology*, Rehm H.J. y Reed G. eds., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2, 572-605.

Lecadet M.M. y Martouret D. (1967). Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. *J. Invert. Pathol.* 9, 322-330.

Lee Y.H. y Luk S. (1983). Aeration. En: *Annual Report of Fermentation Processes*, Academic Press, 6, 101-147.

Luthy P. y Ebersold H.R. (1981). The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Pharmacol. Ther.* 13, 257.

Luthy P., Cordier J.-L. y Fischer H.-M. (1982). *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: Basic considerations and application. En: *Microbial and Viral Pesticides*, E. Kurstak. ed., Marcel Dekker, New York.

Margaritis A. y Zajic E.J. (1978). Mixing, mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 939-1001.

Martínez A., Galindo F.E. y Salvador F.M. (1989). Sparger position effect over K_La in bench and pilot stirred-tank fermentors. *J. Ferment. Bioeng.* 68, 71-73.

Mc. Gregor R. y Gutierrez O. (1983). Guía de insectos nocivos para la agricultura en México. Edit. Alhambra Mexicana, México, 17-42.

Metha U.D. y Sharma M.M. (1971). Mass transfer in mechanically agitated gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.*, 26, 461-479.

Middleton J.C. (1985). Gas-liquid dispersion and mixing. En: *Mixing in the process industries*, Harnby N, Edwards M.F. y Nienow A.W. eds., Butterworth & Co. LTD. U.K., 322-355.

Midoux N. y Charpentier J.-C. (1984). Mechanically agitated gas-liquid reactors, Part I Hydrodynamics. *Int. Chem. Eng.* 24, 249-287.

Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.

Moresi M. y Patete M. (1988). Prediction of K_La in conventional stirred fermenters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 42, 197-210.

Mouches C. (1989). Insectos e insecticidas. En: *Interface, Ciencia y tecnología de Francia.* 32, 17-18.

Mukhopadhyay S.N. y Ghose T.K. (1976). A simple dynamic method of K_{La} determination in laboratory fermenter. *J. Ferment. Technol.* 54, 405-419.

Nickerson K.W. y Bulla Jr. L.A. (1974). Physiology of spore forming bacteria associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 28, 124-128.

Niembro C.E. (1982). III Reunion de consulta sobre uso adecuado de plaguicidas en América Latina y el Caribe. Nota periodística, *El Universal*, 2 de Marzo, 17-18.

Nienow A.W., Haozhung W., Houxing L. y Allsford K.V. (1986). The advantage of using large ring spargers with standar rushton turbines in gassed reactors. *World Congress III of Chemical Engineering, Tokio, Japon*, 3, 354-357.

Nishikawa M., Nakamura M., Yagi H. y Hashimoto K. (1981). Gas absorption in aerated mixing. *J. Chem. Eng. Jpn.* 14, 219-229.

Oldshue J.Y. (1966). Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnol. Bioeng.* 8, 3-24.

Oldshue J.Y. (1983). *Fluid mixing technology*. Mc Graw Hill Pub. Co., New York.

Oldshue J.Y. y Connolly P.L. (1977). Chem. Eng. Prog. 73, 85.

Onken U. y Liefke E. (1989). Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 40, 137-169.

Pearson D. y Ward O.P. (1988). Effect of Culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnol. Lett. 10, 451-456.

Rimington A. (1989). The production and use of microbial pesticides in the USSR. Int. Ind. Biotechnol. 9, 10-14.

Robinson C.W. y Wilke C.R. (1972). Oxygen volumetric mass transfer coefficients in agitated basal salt solutions simulating fermentation media. Proc. IV IFS; Ferment. Technol. Today, 73-82.

Rodríguez M.M. (1990). Comportamiento cinético de *Bacillus thuringiensis* en cultivo continuo. VII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, Oaxtepec, Morelos, México.

Rowe E.G. (1990). Central metabolism of *Bacillus thuringiensis*. Ph. D. Thesis. The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

Rowe E.G. y Margaritis A. (1987). Bioprocess developments in the

production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6, 87-127.

Salvador F.M. (1988). Escalamiento de procesos de fermentación. CEIINGEBI, UNAM.

Sanidad Vegetal, SARH (1990).

Sato S., Mukataka S., Kataoka M. y Takahashi J. (1981). Oxygen absorption rate in an aerated stirred tank under increasing pressure. J. Ferment. Technol. 59, 221-225.

Saval B.S. y Garcia H.F. (1987). Analisis de los criterios para el escalamiento de procesos biotecnológicos. Curso de Maestría, IIB-UACPYP-CCH-UNAM, 87-2.

Smirnoff W.A. y Perrow J.M. (1965). A method of determining the rate of development of *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*. J. Invertebr. Pathol. 7, 320-324.

Smith R.A. (1982). Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Can. J. Microbiol. 28, 1089-1092.

Stanbury P.F. y Whitaker A. (1984). Principles of fermentation technology, Pergamon Press, Oxford U.K., 169-192.

Sweere P.J., Luyben K.Ch.A.M. y Kossen N.W.F. (1987). Regime analysis and scale-down: Tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 386-398.

Trilli A. (1986). Scale-up of fermentations. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain A.L. y Solomon N.A. eds., American Society for Microbiology, Washington D.C., 277-307.

Van't Riet K. (1979). Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 18, 357-364.

Vardar-Sukan F. (1985). Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors, Part I. Operating variables affecting mass transfer. *Process Biochem.* 20, 181-184.

Vardar-Sukan F. (1986). Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors, Part II. Design variables. *Process Biochem.* 21, 40-44.

Villafaña R.J. (1990). Evaluación de alternativas para la recuperación de los productos entomopatógenos de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, México.

Votruba J., Sobotka M. y Prokop A. (1977). Evaluation of aeration capacity from cultivation data files: Application to large-scale

fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1553-1556.

Zamola B., Valles P., Meli G., Miccoli P. y Kajfez F. (1981). Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1079-1086.

Zlokarnik M. (1978). Sorption characteristics for gas-liquid contacting in mixing vessels. *Adv. Biochem. Eng.* 8, 133-151.

APENDICE A

A.1 METODO DEL BALANCE PARA DETERMINAR $K_L a$ Y $q_{O_2} X(COUR)$.

Bajo condiciones de aireación y agitación en un sistema gas-líquido bien mezclado, el balance de oxígeno en el fermentador es:

$$O_{2e} = O_{2medio} + O_{2celular} + O_{2s} \dots\dots\dots (A.1)$$

Asumiendo que la densidad y los flujos volumétricos del aire a la entrada y la salida son iguales (o los cambios despreciables), el balance de oxígeno de A.1 puede ser expresado como:

$$\rho_a Q y_o = v \frac{dCl}{dt} + v q_{O_2} X + \rho_a Q y_s \dots\dots\dots (A.2)$$

Para fermentadores de laboratorio con fases gas-líquido bien mezcladas, puede ser asumido que el gas de salida contiene el mismo porcentaje de oxígeno que la fase gas del fermentador. De la ec. A.2 podemos escribir la ecuación de velocidad para transferencia de oxígeno en el caldo como:

$$\frac{dCl}{dt} = \frac{\rho_a Q}{v} (y_o - y_s) - q_{O_2} X \dots\dots\dots (A.3)$$

Además, la velocidad de transferencia de oxígeno a la fase líquida de un cultivo aireado y agitado es:

$$\frac{dCL}{dt} = KLa (C^* - CL) - qO_2 X \dots\dots\dots (A.4)$$

Igualando A.3 y A.4 :

$$KLa (C^* - CL) - qO_2 X = \frac{\rho_a Q}{V} (y_o - y_g) - qO_2 X \dots (A.5)$$

Obtenemos la concentración de oxígeno disuelto en el caldo como:

$$CL = - \frac{\rho_a Q}{KLa V} (y_o - y_g) + C^* \dots\dots\dots (A.6)$$

En la ec. A.6 bajo las condiciones y las suposiciones hechas, las únicas variables son CL y y_g . Debido a que A.6 es una línea recta, una gráfica de CL vs $(y_o - y_g)$ nos dará una recta teniendo una pendiente $-\rho_a Q/KLa V$ interceptando en C^* . En base a que todas las variables son conocidas por las condiciones experimentales, KLa puede ser evaluado de esta pendiente.

La velocidad de consumo de oxígeno $qO_2 X$ puede ser calculada reorganizando la ec. A.3:

$$qO_2 X = \frac{\rho_a Q}{V} (y_o - y_g) - \frac{dCL}{dt} \dots\dots\dots (A.7)$$

Debido a que dCL/dt es muy pequeño, se puede despreciar:

$$qO_2 X = \frac{\rho_a Q}{V} (y_o - y_g) \dots\dots\dots (A.8)$$

A.2 SISTEMA QUIMICO CON SULFITO DE SODIO.

Debido a que el método del balance con sulfito de sodio para medición de KLa es químico e involucra una reacción química (r), es posible escribir A.3 y A.4 como:

$$\frac{dCl}{dt} = \frac{\rho_a Q}{V} (y_o - y_s) - r \dots \dots \dots (A.9)$$

$$\frac{dCl}{dt} = KLa (C^* - Cl) - r \dots \dots \dots (A.10)$$

Igualando A.9 y A.10 tenemos:

$$KLa (C^* - Cl) = \frac{\rho_a Q}{V} (y_o - y_s) \dots \dots \dots (A.11)$$

En presencia de un catalizador de cobre, la oxidación del sulfito toma lugar instantáneamente. Se ha reportado que la velocidad de absorción de oxígeno en solución de sulfito de sodio iguala la velocidad de absorción física máxima en un sistema gas-líquido bien mezclado, por lo tanto es posible suponer Cl = 0 en A.11; rearrreglando tenemos:

$$KLa = \frac{\rho_a Q}{C^* V} (y_o - y_s) \dots \dots \dots (A.12)$$

Así es posible determinar KLa de un fermentador usando el método del sulfito, basado sobre un cambio en el porcentaje de oxígeno en el aire de salida del fermentador, y calculando el valor máximo de agotamiento de oxígeno en la fase gas (y_o-y_s).

Cualquier analizador de oxígeno permite la determinación de este factor. Los demás factores C^* , ρ_a , Q y V son conocidos.

Todas estas ecuaciones (A.1-12) fueron utilizadas solo a nivel de laboratorio.

Para determinar C^* se utiliza la ley de Henry para gases con baja solubilidad:

$$p = H \cdot C^* \dots \dots \dots (A.13)$$

Bajo condiciones de saturación de oxígeno disuelto, el equilibrio es establecido entre el oxígeno en la fase gas y el oxígeno disuelto.

A nivel de planta piloto se emplearon las ecuaciones reportadas por VOTRUBA et al (1977) (ec. A.14) para el método del balance a nivel industrial, y la reportada por COONEY (1961) para determinar OUR (ec. A.15). Estas ecuaciones son:

$$\frac{P \cdot M}{R \cdot T} \frac{d(y_0)}{dt} = \frac{P \cdot M \cdot F_{in}}{R \cdot T \cdot V} \left(\frac{y_0}{1 - y_0} - \frac{y_0}{1 - y_0} \right) - KLa \left((p/H)y_0 - C_L \right) \quad (A.14)$$

$$OUR = \frac{F_{in}}{V} \left[\frac{pO_2^*}{P - pO_2^* - p_{CO_2}} - \frac{pO_2^*}{P - pO_2^* - p_{CO_2}} \right] \quad (A.15)$$

Comparando las ecuaciones A.12 con A.15, se observa que son similares. La principal diferencia estriba en que la ecuación A.12 utiliza como base de cálculo el flujo de aire como tal ($Q = 1$

aire/h), mientras que la ecuación A.14 utiliza como base de calculo el flujo de inerte ($F_{in} = 1 \text{ N}_2/\text{h}$), el cual permanece constante durante todo el proceso. El mismo concepto se aplica a las ecuaciones A.8 y A.15.