

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**"ESTUDIO SOBRE LOS PARAMETROS DE
FERMENTACION DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL
DURANTE LA PROPAGACION DE *Bacillus*
thuringiensis var. *kumamotoensis* C-4 PARA
PRODUCCION DE BIOINSECTICIDAS"**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

POR

HIRAM MEDRANO ROLDAN

MONTERREY, N.L.

OCTUBRE 1992

TD

Z5320

FCB

1992

M4



1020066520

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**"ESTUDIO SOBRE LOS PARAMETROS DE
FERMENTACION DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL
DURANTE LA PROPAGACION DE *Bacillus*
thuringiensis var. *kumamotoensis* C-4 PARA
PRODUCCION DE BIOINSECTICIDAS"**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

POR

HIRAM MEDRANO ROLDAN

MONTERREY, N.L.

OCTUBRE 1992

TD
Z 5320
FCB
1992
M4



FONDO TESIS

32607

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**"ESTUDIO SOBRE LOS PARAMETROS DE FERMENTACION DE
IMPORTANCIA INDUSTRIAL DURANTE LA PROPAGACION DE
Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4 PARA PRODUCCION DE
BIOINSECTICIDAS"**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE **DOCTOR EN CIENCIAS** CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

POR

HIRAM MEDRANO ROLDAN

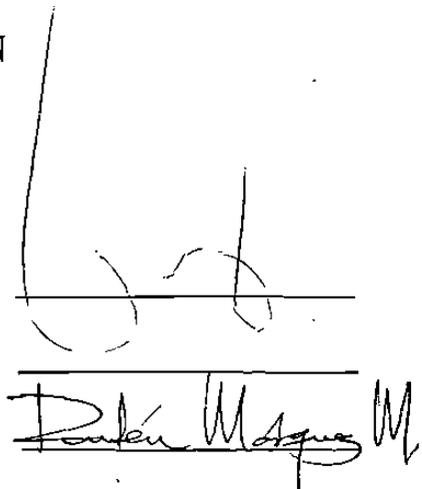
COMISION DE TESIS

APROBADA:

Dr. Reyes S. Tamez Guerra, Presidente (Director)

Dra. Laura Trejo Avila, Secretario (Co-Director)

Dr. Ruben Márquez Meléndez, Vocal (Co-Director)



POR LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Dra. Laura Trejo Avila, Presidente del Comité Doctoral _____

Dra. Julia Verde Star, Subdirectora de la División _____

MONTERREY, N.L.

OCTUBRE 1992

*" Cuando todo esta dicho y hecho, el éxito sin
la felicidad es la peor clase de fracaso "*

Louis Binstock

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto de investigación realizado en forma multidisciplinaria entre profesores y técnicos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., el CIIDIR-IPN Unidad Durango, la Delegación Estatal de la S.A.R.H. en Durango y el Instituto Tecnológico de Durango.

El autor desea manifestar que el desarrollo de proyectos de investigación con la participación de especialistas en Microbiología, Bioquímica e Ingenierías Bioquímica, Química, Mecánica e Industrial, es toda una realidad.

DEDICATORIAS

Doy Gracias **Al Gran Arquitecto del Universo** por permitirme ver, aunque un poco tarde, la cristalización del diseño y construcción de este proceso de formación académica e investigación.

A **Yima Jahiel, Hiram Ayax y Eréndira Berenice**: las tres razones más importantes para la constante de mantenimiento de la cinética de mi vida.

A **tí**, quien siempre serás mi resultado más valioso de amor experimental. Gracias por tu paciencia y comprensión, pero más aún, por el tiempo que te robé.

Al **Dr. Carlos Casas Campillo**: mi amigo y maestro, cuya honestidad y amor a la investigación han sido sustrato de fortaleza y motivación en mi quehacer de formación de células nuevas en este mundo maravilloso de la Biotecnología.

A mis queridos amigos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., a todos ellos: **¡MUCHAS GRACIAS POR SU AMISTAD!**

RECONOCIMIENTOS

- **Al M.C. Luis J. Galán Wong, Dr. Reyes S. Tamez Guerra y Dra. Laura Ma. Trejo Avila** por su decidido apoyo en la culminación de este trabajo de investigación, que forma parte del apoyo brindado al Instituto Tecnológico de Durango. **¡ MUCHAS GRACIAS !**
- A mis sinodales y miembros del Comité Doctoral por darme la oportunidad de consolidar parte del esfuerzo realizado en este proyecto multidisciplinario de investigación.
- **Al Dr. Rubén Márquez Meléndez** por acompañarme en el desarrollo de esta empresa biotecnológica de investigación. Gracias por su confianza.
- **Al Dr. Andy Rao** de la Universidad de Cornell E.U.A. por la revisión y crítica de los resultados reológicos de este trabajo experimental.
- A mis exalumnos y ahora profesores jóvenes de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.: **Katy, Lucía, Marivel, Magda, Hugo y Benito**. Mi agradecimiento por su apoyo en bioensayos, datos de planta piloto, computación, etc. **¡ GRACIAS !**
- A los ingenieros **Víctor Hugo Córdova Granados, Uciel Tello Ruíz** y **Sergio Peraza** de la Delegación Estatal en Durango de la S.A.R.H. por la aplicación del bioinsecticida a nivel de campo.
- **Al M.C. Cipriano García Gutiérrez** del CIIDIR-IPN Unidad Durango, por su apoyo en bioensayos y aplicación del bioinsecticida a nivel de campo.
- **Al CONACYT y COSNET** por el financiamiento otorgado a través de 3 proyectos de investigación el primero y 2 el segundo, durante 5 años de trabajo a nivel de Laboratorio, planta piloto y campo.
- A mis estudiantes de Licenciatura y Posgrado, cuyo esfuerzo y desarrollo de habilidades en Biotecnología, forman parte de este trabajo de investigación.
- Al grupo de Biotecnología del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Durango. Gracias por el apoyo y confianza que siempre me han brindado.

RESUMEN

El comportamiento reológico de un medio de cultivo puede conducir a una serie de efectos sobre la eficiencia de un proceso de fermentación. Estos efectos, son difíciles de predecir y son consecuencia de las características geométricas del reactor biológico, así como de los parámetros de operación. Es poco lo que se conoce sobre la propagación de *Bacillus thuringiensis* para la producción de insecticidas biológicos, lo cual, puede constituirse como un problema para el escalamiento del proceso de fermentación a nivel industrial. Después de revisar exhaustivamente sobre este tema, y de estudiar los requerimientos de oxígeno de una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 propagándola a nivel de planta piloto, se establecieron los objetivos de este trabajo de investigación: primero, estudiar las influencias independientes del tamaño y velocidad de los impulsores, así como de la concentración de oxígeno disuelto sobre la cinética de consumo de oxígeno y la producción de células; segundo, caracterizar la reología del medio de cultivo *in situ*; tercero, analizar los resultados en términos de esfuerzo cortante, bombeo de los impulsores y tiempo de mezclado y, cuarto, dilucidar el efecto de transferencia de masa relacionándola con el aumento en la producción celular, como una función del aumento en la calidad del mezclado. La cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, mostró bajos requerimientos de oxígeno mientras que los parámetros relacionados con los impulsores mostraron una influencia significativa e independiente con la producción celular y la cinética de consumo específico de oxígeno. Sobre el fenómeno de transferencia de masa, se observó poca resistencia al transporte de nutrientes al interior de la célula, al hacer una relación de esta resistencia con el crecimiento celular. Se determinaron coeficientes específicos de transferencia de masa para dos geometrías de impulsores y velocidades de agitación, demostrándose que estos coeficientes fueron directamente proporcionales a la capacidad de bombeo de los impulsores. Finalmente, los bioensayos y las pruebas de campo efectuados con el bioinsecticida producido, manifestaron la posibilidad que este estudio de Biotecnología Industrial pueda convertirse en un conocimiento de tipo tecnológico para su industrialización y comercialización.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	2
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	8
1.- Introducción	10
1.1.- Parámetros físicos independientes del sistema de fermentación.	11
1.2.- Parámetros biológicos dependientes del sistema de fermentación.	11
1.3.- Parámetros físicos en los procesos de fermentación con <i>Bacillus thuringiensis</i> .	11
1.4.- Revisión de Literatura	17
1.4.1.- Reología de medios de fermentación.	17
1.4.2.- Influencia de los parámetros del reactor biológico sobre la actividad biológica.	19
1.4.2.1.- Transferencia de oxígeno gas-líquido.	19
1.4.2.2.- Transferencia de oxígeno líquido-célula.	21
1.4.3.- El sistema de mezclado en un reactor biológico.	22
1.4.4.- Mezclado en fermentadores.	25
1.4.5.- Esfuerzo cortante en fermentadores.	27
1.4.6.- El consumo de oxígeno en microorganismos.	27
2.- Programa de Investigación.	29
2.1.- Importancia de la velocidad de consumo de sustrato.	29
2.2.- El papel del mezclado en un reactor biológico.	30
2.3.- Reología y teoría de la agitación.	32
2.3.1.- Reología.	32
2.3.2.- Agitación y energía de agitación.	32
2.3.3.- Comportamiento de flujo y mezclado.	33
2.3.4.- Selección del tipo y tamaño de un agitador para mezclado y bombeo eficientes.	34
2.3.5.- Efecto del tamaño del reactor sobre el sistema de mezclado (Scale Up).	35
2.4.- Establecimiento del problema y objetivos del	35

trabajo experimental de tesis.

3.- Equipo, Materiales y Métodos.	37
3.1.- Microorganismo.	37
3.2.- Medios de cultivo.	37
3.3.- Preparación de semilla o inóculo.	37
3.4.- Equipo de fermentación.	38
3.5.- Concentración de oxígeno disuelto.	38
3.6.- Proceso de fermentación.	38
3.7.- Determinación de azúcares, reductores.	38
3.8.- Cuenta viable de colonias por mililitro.	39
3.9.- Cuenta de esporas viables.	39
3.10.- Bioensayos y pruebas de campo.	39
3.11.- Medición de consumo de energía de mezclado.	39
3.12.- Medición de la reología del medio de cultivo in situ e in vitro.	39
3.13.- Medición de los tiempos de mezclado.	41
3.14.- Determinación de peso seco.	41
3.15.- Determinación del coeficiente de rendimiento.	42
3.16.- Determinación de la demanda de oxígeno y el coeficiente de transferencia de oxígeno.	42
3.17.- Determinación del coeficiente de transferencia de masa líquido-sólido.	42
4.- Resultados y Discusión.	43
4.1.- Estudios preliminares.	43
4.1.1.- Microorganismo y medio de cultivo.	43
4.1.2.- Caracterización de los impulsores.	43
4.2.- Proceso de fermentación para la producción del bioinsecticida.	44
4.2.1.- Efecto de la aeración y agitación sobre la actividad biológica de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	44
4.2.2.- Influencia de la velocidad de agitación so- bra la cinética de consumo de oxígeno de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	45
4.2.3.- Influencia de la dimensión del impulsor sobre el consumo de oxígeno por <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	46
4.2.4.- Discusión de la influencia de las dimensiones y la velocidad de los impulsores sobre el consumo de oxígeno.	47
4.2.5.- Aspectos reológicos y de mezclado en el medio de	48

	cultivo para la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	
4.3.-	Cuantificación de la reología in situ a través de la medición del consumo de potencia.	49
4.4.-	Tiempos de mezclado en el reactor experimental.	56
4.4.1.-	Mezclado del medio de cultivo para la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	57
4.4.2.-	Influencia del tiempo de mezclado sobre la cinética de consumo de oxígeno por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	58
4.5.-	Efecto de los parámetros del impulsor sobre la calidad de la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.	62
4.6.-	Bioensayos y respuesta del bioinsecticida a nivel de campo experimental	63
5.-	Importancia	63
6.-	Conclusiones	65
7.-	Recomendaciones para una futura investigación	65
8.-	Abreviaturas	68

LITERATURA CITADA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA No.	TITULO
1	Diagrama esquemático del equipo de fermentación empleado.
2	Parámetros físicos relacionados con la cinética microbiana.
3	Variables que influyen en la velocidad de consumo de oxígeno en la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .
4	Variables presentes en el consumo de oxígeno en la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .
5	Representación esquemática del esfuerzo cortante en un reactor biológico. Influencia del impulsor sobre la concentración crítica de oxígeno disuelto.
6	Relación entre el número de potencia (N_p) y el Número de Reynolds (N_{Re}) en diferentes tipos de impulsores.
7	Curva de crecimiento típica de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.
8	Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.
9	Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4.
10	Efecto de la capacidad de bombeo del impulsor sobre el coeficiente de transferencia de masa líquido-sólido.
11	Consumo de energía contra velocidad del impulsor en la propagación de <i>Bacillus thuringien-</i>

sis var. kumamotoensis C-4.

- 12 **Esfuerzo cortante contra velocidad de corte del medio de cultivo durante la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4***
- 13 **Reología aparente del medio de cultivo en la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4.***
- 14 **Número de Reynolds para impulsores en la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4.***
- 15 **Efecto de la concentración celular y la velocidad del impulsor tipo Turbina I sobre la reología in situ de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4.***
- 16 **Efecto de la concentración celular y la velocidad del impulsor tipo Turbina II sobre la reología in situ de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4.***
- 17 **Correlación para tiempos de mezclado en el reactor utilizado.**
- 18 **Correlación de tiempos de mezclado en la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis C-4.***
- 19 **Relación del producto de la velocidad específica de consumo de oxígeno y el tiempo de mezclado con la concentración de oxígeno disuelto para dos tipos de impulsores.**

LISTA DE TABLAS

TABLA No.	TITULO
1	Parámetros físicos independientes del sistema de fermentación.
2	Parámetros biológicos dependientes del sistema de fermentación.
3	Composición del medio de cultivo para la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4 a escala de planta piloto.
4	Efecto de la velocidad de agitación en la cinética microbiana de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4 a escala de planta piloto.
5	Efecto de la velocidad de agitación en la esporulación, tiempo de proceso y el número de esporas durante la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4 a escala de planta piloto.
6	Efecto de la velocidad de aeración en la cinética microbiana de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4 a escala de planta piloto.
7	Efecto de la velocidad de aeración en la esporulación, tiempo de proceso y el número de esporas durante la propagación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4 a escala de planta piloto.
8	Parámetros reológicos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i> C-4 después de la fase exponencial de crecimiento.
9	Comparación de las propiedades reológicas del medio de propagación de <i>Bacillus thuringien-</i>

sis var. *kumamotoensis* C-4 medidas in situ e in vitro.

- 10 Tiempos de mezclado representativos en la -- propagación de *Bacillus thuringiensis* var. - *kumamotoensis* C-4.
- 11 Escalamiento de un proceso para la producción de bioinsecticidas empleando como criterio el tiempo de mezclado en el reactor.
- 12 Relación entre la velocidad de agitación, la velocidad específica de consumo de oxígeno y la productividad de cristales en la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.
- 13 Pruebas experimentales a nivel de campo para combatir el gusano cogollero del maíz (*Spo- doptera frugiperda*) empleando el bioinsecti- cida producido por *Bacillus thuringiensis* --- var. *kumamotoensis* C-4.

1.- INTRODUCCION

Hasta ahora, la mayoría de los reactores biológicos que se utilizan en la industria, se agitan mediante el uso de impulsores tipo Rushton, llamadas así, en reconocimiento al trabajo intenso llevado a cabo en investigación sobre mezclado por J.H. Rushton y sus colaboradores en la década de los cincuenta (31,166,167). Usualmente, la configuración de un reactor biológico con estas características de mezclado se mira como el que se muestra en la Figura 1 (8,9). Así mismo, existe una gran variedad de fermentaciones industriales que utilizan formulaciones de medio de cultivo y sistemas microbianos que conducen a la presencia de un fluido No-Newtoniano, el cual, desde el punto de vista de mezclado para el logro de niveles satisfactorios de productividad, rendimiento y eficiente transferencia de masa y de calor, es complicado (5,13, 23,25,30).

A este respecto, el trabajo realizado tanto por investigadores de la industria, centros de investigación e instituciones educativas, se ha enfocado a la solución del problema a través de la manipulación genética y el desarrollo de medios de cultivo para mejorar la calidad de los procesos de fermentación, siendo sus resultados muy alentadores (34,40,64,68,106). Sin embargo, cuando la solución se pretende encontrar mediante la aplicación de una ingeniería racional en el diseño y construcción de reactores biológicos, los estudios han resultado difíciles debido al alto grado de dificultad que presentan los fluidos de tipo No-Newtoniano (32,35,36).

Uno de los aspectos de mayor importancia en el diseño de reactores biológicos es el mezclado, el cual, desde el punto de vista histórico, ha recibido gran atención(15,16,161,162,166,167) siendo J.H. Rushton uno de los investigadores principales quien estableció una serie de criterios para la solución de los problemas de mezclado (166,167). Así, con la sugerencia de diferentes diseños de impulsores, se pudo constatar la alternativa de conocer las características de la dispersión de una fase gaseosa en proceso de fermentación, concluyendo que los impulsores tipo turbina con diámetro de 1/3 del diámetro del reactor, pueden producir una situación que obligue al gas a pasar por la región de alto esfuerzo cortante en las paletas del impulsor donde ocurre el rompimiento de las burbujas de gas (148, 149). Con este conocimiento y con el soporte de expertos en ingeniería, los fabricantes de sistemas de mezclado pusieron en el mercado los impulsores tipo Rushton (149,180).

Sin embargo, en los textos de Biotecnología y Bioingeniería, es poco lo que se expone sobre el trabajo intenso de J.H. Rushton sobre dinámica de fluidos debido, probablemente, a que durante mucho tiempo predominó la idea que el mejoramiento de un proceso de fermentación no se podía lograr a través de un cambio positivo en el sistema de mezclado (4,21,140,196). Esto, a su vez, fue debido a que si bien era cierto que los parámetros físicos asociados con el diseño y funcionamiento del reactor estaban bien caracterizados, la eficiencia del sistema, en cualquier tipo de aplicación, estaría relacionado con parámetros de tipo biológico, y así, el sistema se volvería altamente específico. Con lo anterior, la eficiencia total del reactor podría ser determinada a través de los dos conjuntos

de parámetros siguientes:

1.1.- PARAMETROS FISICOS INDEPENDIENTES DEL SISTEMA DE FERMENTACION

En cualquier reactor biológico existe un conjunto de parámetros de los cuales se pueden realizar algunos estudios independientemente de las condiciones del proceso de fermentación. Estos parámetros se enlistan en la Tabla 1 y, además de que los resultados se pueden obtener con relativa facilidad y en forma rápida, estos pueden ser utilizados en la cuantificación el diseño y la eficiencia del proceso de fermentación. Cabe mencionar que estos parámetros no son específicos del sistema de fermentación, pero sí lo son de la geometría del sistema de mezclado del reactor(17,18,19,20,21,36).

1.2.- PARAMETROS BIOLOGICOS DEPENDIENTES DEL SISTEMA DE FERMENTACION

El conjunto de parámetros relacionados con el comportamiento biológico y que son específicos del sistema de fermentación, se pueden ver en la Tabla 2 y, aunque son dependientes de los aspectos no específicos del sistema de mezclado, solamente pueden ser estudiados durante el proceso de fermentación, es decir, cuando las reacciones de tipo biológico están presentes. Las características específicas del sistema de fermentación relacionan a la sensibilidad de las reacciones bioquímicas con factores tales como el oxígeno disuelto, los componentes del medio de cultivo y el pH. Así pues, aún cuando los parámetros no específicos de un sistema de fermentación sean muy entendidos y que se considere que un reactor biológico es adecuado para un proceso y no para otro, en éste último se pueden realizar experimentos para conocer el comportamiento biológico del sistema microbiano (26,29,79,85, 93,107).

1.3.- PARAMETROS FISICOS EN LOS PROCESOS DE FERMENTACION CON *Bacillus thuringiensis*

Hay procesos de fermentación a nivel industrial que utilizan medios de cultivo semejantes en reología al que se emplea en la propagación de *Bacillus thuringiensis* (1,24,25,26,60,64,124). En principio, la presencia de materiales como el agua de cocimiento de maíz, las harinas de soya, sangre y pescado, así como harinolina y otros mas, le dan una característica reológica que invitan al Biotecnólogo a estudiar una serie de fenómenos que participan en el éxito de la propagación bacteriana así como en los de tipo técnico y económico (14,125,126,129,135).

Hay procesos de fermentación a nivel industrial que utilizan medios de cultivo semejantes en reología al que se emplea en la propagación de *Bacillus thuringiensis* (1,24,25,26,60,64,124). En principio, la presencia de materiales como el agua de cocimiento de maíz, las harinas de soya, sangre y pescado, así como harinolina y otros mas, le dan una característica reológica que invitan al Biotecnólogo a estudiar una serie de fenómenos que participan en el éxito de la propagación bacteriana así como en los de tipo técnico y económico (14,125,126,129,135).

Como ya se mencionó con anterioridad, la mayoría de los investigadores han enfocado sus esfuerzos hacia los aspectos de manipulación genética y optimización de los medios de cultivo con el fin de alcanzar el éxito deseado (7,10,12). Sin embargo, los métodos de ingeniería es algo que no está bien estudiado dada la complejidad que se presenta para su estudio y, en el caso de *Bacillus thuringiensis*, no podría ser la excepción.

Se sabe que la cinética microbiana, durante el proceso de fermentación, es una función de la genética o del potencial inherente de las células, su concentración, estado fisiológico, así como el ambiente que prevalece (24,68,121). Con respecto a éste último, se puede mencionar a la temperatura, pH, concentración de nutrientes y de producto, así como los esfuerzos mecánicos que se presentan sobre la superficie celular (155). Sin embargo, cuando se presenta una formulación de medio de cultivo como sucede con *Bacillus thuringiensis*, el medio ambiente que rodea a la célula, está relacionado indirectamente con el medio de cultivo, exclusivamente (180). Así pues, la cinética microbiana está en función de un medio ambiente que está fuertemente influenciado por parámetros físicos tales como: el diseño del reactor, la velocidad de aeración y agitación y, todo este conjunto de factores, desafortunadamente, en relación a *Bacillus thuringiensis*, no existe información suficiente (57,58, 59,63).

Las propiedades más importantes de tipo físico que caracterizan al medio de cultivo para la propagación de un microorganismo es, en principio, su viscosidad aparente y, enseguida, su comportamiento reológico (25,27,50,51,54,131).

Estas propiedades provienen de los materiales en suspensión, como lo son las propias células y las partículas de algunos ingredientes del medio de cultivo como el agua de cocimiento de maíz y las harinas de soya, sangre y pescado, o bien, la harinolina, sin embargo, lo más complejo proviene de la reología del medio de cultivo, ya que, complica la suplementación de oxígeno a las células (110). Este último problema, es típico de las fermentaciones aeróbicas, debido al grado de dificultad que se presenta en la solubilización del oxígeno, además de que, siempre es requerido en grandes cantidades por el sistema microbiano (77,88,89,90). Por otro lado, es posible que se establezca una solubilización buena de oxígeno y tenerse el problema de una suplementación baja a las células (44).

Cuando se presentan problemas como los que se han mencionado hasta ahora, casi siempre es conveniente empezar dentro de lo que es el análisis de la influencia de los parámetros físicos sobre la cinética microbiana, con la definición del papel que juega la reología del medio de cultivo sobre la eficiencia de la fermentación, especialmente en lo que

se refiere a la suplementación de oxígeno a las células.

Con el fin de exponer claramente este tipo de situación, en la Figura 2 se observa la relación existente entre la reología del medio de cultivo y los parámetros de operación así como todos aquellos aspectos que podrían influir en la productividad del fermentador (Unidad de Producto / Unidad de Volumen x Unidad de Tiempo). Para entender la Figura 2, se requiere establecer cuáles son las variables que más influencia tienen sobre la productividad de un tanque agitado, lo cual, puede escribirse de la manera siguiente:

S I M B O L O	D E S C R I P C I O N
C_e	Concentración de oxígeno en el gas de entrada
C_L	Concentración de oxígeno el medio de cultivo
C_o	Concentración de oxígeno en el gas de salida
C_s	Concentración de oxígeno en la célula
C	Concentración de oxígeno en equilibrio
D_i	Diámetro del Impulsor
D_T	Diámetro del tanque
F_A	Velocidad de flujo de aire
H_{O_2}	Constante de la Ley de Henry
H_i	Altura del líquido en el tanque
K_{L_s}	Coefficiente de Transferencia de Masa Gas-Líquido
J	Coefficiente de Transferencia de Masa Líquido-Célula
n	Índice Reológico de Comportamiento de Flujo
N	Velocidad de los Impulsores
Q_{O_2}	Velocidad Específica de Consumo de oxígeno
Q_p	Velocidad Específica de Síntesis de Producto
V_s	Velocidad superficial del gas
V_T	Volumen del tanque
dv/dy	Velocidad de corte
X	Concentración de células
φ_s	Fracción de volumen en fase sólida
φ_G	Fracción de volumen en fase gaseosa
μ_o	Viscosidad en la fase continua

μ_G	Viscosidad en fase gaseosa
μ_a	Viscosidad Aparente

Mientras que algunos parámetros han sido simplificados y otros omitidos, en la Figura 2, la transferencia de oxígeno entre las fases líquida y gaseosa está establecida como de gran interés, lo cual se hace con el fin de reconfirmar su vital importancia en las fermentaciones aeróbicas y, por otro lado, las variables metabólicas de los microorganismos, han sido simplificadas considerablemente y es que, en realidad, la temperatura, el pH, así como la concentración de productos y nutrientes tienen función de control tanto en velocidad como en fisiología (91,92,95,96,97). Similarmente, la única propiedad física mostrada del medio de cultivo, es su reología; sin embargo, el Biotecnólogo tiene que ser realista y considerar que otras propiedades como la tensión superficial, densidad, concentraciones molares totales, etc., pueden ser esperadas a ejercer su influencia sobre la productividad del fermentador y la calidad del producto a obtener, que en nuestro caso, es un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* (138,141,146, 147,150,151,199).

Desde el punto de vista de consumo de energía, debe mencionarse que aquella que proviene del sistema de agitación está íntimamente relacionada con el microorganismo a través del medio de fermentación (171,173,176). Así pues, la reología del medio se puede constituir en un mediador de toda la energía que aparece en el proceso, la cual podría, asimismo, determinar la productividad biológica. Por otro lado, para determinar los perfiles de velocidad, debe tenerse la expectativa de que la reología del medio de fermentación habrá de afectar directamente la magnitud y proporción de la energía disipada por el conjunto de impulsores en forma de esfuerzo cortante y patrón de flujo; ambos mecanismos, son los que habrán de determinar la uniformidad del medio de fermentación, la velocidad de transferencia de masa y los esfuerzos cortantes que actúan sobre la fase gaseosa y la fase constituida por el microorganismo, por ello, se puede considerar al esfuerzo cortante producido por los impulsores, así como a los patrones de flujo, como los causantes físicos de la productividad biológica.

Lo expuesto hasta ahora, indica que es complicado hacer una separación de las causas y efectos específicos. Por otro lado, en lo concerniente a *Bacillus thuringiensis*, es poco lo que se sabe acerca de las relaciones que existen, *in situ*, entre esfuerzo cortante, mezclado y cinética microbiana, por lo que, una información cuantitativa sobre estas relaciones, podría contribuir significativamente al entendimiento de las influencias de una reología, como la que existe en la producción de bioinsecticidas, sobre el comportamiento del proceso de fermentación. Esta información, deberá conducir al establecimiento de una técnica y criterio de escalamiento más sólido así como a la optimización de un diseño del reactor biológico (3,34,35,43,70,93).

Es importante hacer hincapié en que esta investigación habrá de contribuir al logro de la meta que permita relacionar las variables independientes más importantes, tales como

las dimensiones del reactor y de los impulsores, la velocidad de éstos, la composición del medio de cultivo y la velocidad de aeración para el establecimiento de un fluido tipo No-Newtoniano típico en la producción de bioinsecticidas, y así, proveer de un conocimiento fundamental que conduzca al mejoramiento del proceso. Dicho conocimiento, podría beneficiar marcadamente la concentración final de esporas y cristales, la velocidad de esporulación o cualquier otra función objetivo definida, como la productividad volumétrica (unidades/volumen x tiempo). En realidad, un enfoque apropiado para la consecución de modelos matemáticos que permitan establecer relaciones funcionales, es el aplicar los principios de ingeniería afines al mezclado y a la transferencia de masa en tanques agitados, aplicados a las propiedades intensivas del medio de cultivo y a la cinética microbiana de *Bacillus thuringiensis*.

Con respecto a la originalidad de este trabajo de investigación, se puede decir que está respaldada por la poca información que existe sobre la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Por otro lado, se consideró que todos los estudios que tenían que llevarse a cabo, serían alrededor de la influencia que tienen las condiciones de mezclado, la reología del medio de cultivo, el esfuerzo cortante, la velocidad de corte, la geometría de los impulsores, la capacidad de bombeo de éstos, las velocidades de flujo, y los tiempos de mezclado, ya que todos ellos son de gran importancia y no existe información sobre este tipo de comportamientos, por lo que se considera que el trabajo realizado tiene un contenido de originalidad significativo. De acuerdo a la clasificación del bioinsecticida como metabolito secundario y tomando en consideración el tipo de fluido que se obtiene bajo las diferentes formulaciones del medio de cultivo que existen para la producción de bioinsecticidas, podría decirse que el panorama científico que presenta este proyecto es similar con algunos casos que se presentan en la producción de varios compuestos biológicos, aunque sin llegar a extremos como lo son el caso de las fermentaciones miceliales, en las que la problemática está relacionada con la transferencia de oxígeno; el caso que nos ocupa lo está con la transferencia de masa. El interés de investigar sobre el punto anterior, proviene de los resultados de un proyecto de investigación, llevado a cabo en forma mancomunada por el Instituto Tecnológico de Durango, el CIIDIR-IPN Unidad Durango, la Delegación Estatal de la S.A.R.H. en Durango y la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. (71,73,125,126).

Este proyecto, dedicado a la producción de bioinsecticidas empleando cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, consta de una operación unitaria de propagación microbiana que da indicios de comportarse fuera de lo tradicional a como lo hace un fluido de tipo Newtoniano bajo condiciones definidas de aeración y agitación, obteniéndose cinéticas de actividad biológica interesantes, que obligaron a pensar que la propagación de *Bacillus thuringiensis* encierra una información de gran interés en el campo de la Bioingeniería.

Como ya se ha mencionado, la información biotecnológica sobre *Bacillus thuringiensis* es poca, de tal manera que se visualizó un campo de acción en investigación que pudiese detallar el comportamiento de este microorganismo dentro de un reactor biológico, más aún, como en nuestro caso, demostró tener baja demanda de oxígeno y, que ésta, podría estar estrechamente relacionada con la capacidad tóxica del bioinsecticida. Así mismo, aspectos

importantes como el que ocasiona la formulación del medio de cultivo al relacionarlo con los fenómenos de transferencia alrededor de los impulsores o en función de los patrones de flujo ocasionados por las condiciones de mezclado (122,123,124,128).

Con estos antecedentes preliminares, se consideró que se podría establecer si el medio ambiente local que determina la cinética microbiana de las células individuales está relacionado solamente con las condiciones que prevalecen en el medio de cultivo. Ahora bien, debido a que

el esfuerzo cortante y el patrón de flujo que participan en este medio ambiente local son los responsables del comportamiento microbiano, se vienen a convertir en parámetros de importancia industrial y, como consecuencia de ello, de tipo económico. En sí, el esfuerzo cortante ofrecido por los impulsores así como el patrón de flujo provocado por ellos, son variables que dependen de los parámetros del reactor como lo son sus dimensiones, las de los impulsores, así como la velocidad de ellas, la cual, es modulada por la reología del medio de cultivo (131,137,142,143). En realidad, la problemática de la biotecnología de *Bacillus thuringiensis* con respecto a la relación que guardan las variables de ingeniería directamente con la cinética microbiana, se puede establecer por dos razones principales; primero, porque los conceptos de velocidad de consumo de oxígeno y de concentración crítica de oxígeno, dependen de factores no biológicos y, segundo, porque el concepto de reología del medio de cultivo, de la cual depende la toxicología del bioinsecticida, no ha sido estudiado ampliamente (120,191,193,195). Así pues, uno de los objetivos principales de este trabajo de Tesis, consiste en relacionar los parámetros del reactor con la cinética microbiana, sin embargo, el problema específico, es la cuantificación de la influencia de las variables de ingeniería como lo son el esfuerzo cortante y las condiciones de mezclado sobre la cinética microbiana y, más específicamente aún, estudiar la influencia de los esfuerzos cortantes y las condiciones de mezclado sobre la cinética microbiana en relación con los parámetros del reactor y la reología del medio de cultivo, entendiéndose que los resultados obtenidos habrán de conducir al conocimiento de la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*, y así, poder establecer un proceso racional para aspectos de escalamiento a nivel industrial.

Con el fin de expresar más claramente lo anterior, se puede decir que lo que se ha realizado hasta ahora en la propagación de *Bacillus thuringiensis*, permite proponer dos esquemas que muestran la influencia de los aspectos de oxigenación sobre la cinética microbiana (Figuras 3 y 4). Así pues, es conveniente recordar que la velocidad de consumo de oxígeno no se puede predecir, ya que, es función de la concentración celular, del estado fisiológico del microorganismo, de la concentración del oxígeno disuelto y, en su momento, de las dimensiones de los impulsores, de la velocidad de los mismos, de la velocidad de aeración, etc. (140,142,143,144). Para aislar estas interacciones complejas de las variables, se requiere establecer simplificaciones racionales.

En principio, los datos de los procesos de fermentación requieren ser obtenidos bajo un estado fisiológico definido, por ejemplo, al principio de la fase de crecimiento; en este caso, se considera que, si se hace uso de un inóculo saludable, la población celular será más

uniforme, en ese momento, que en cualquier otra etapa de la fermentación, y así, la velocidad de consumo de oxígeno puede ser calculada en bases específicas para ver la influencia de la concentración celular sobre la velocidad volumétrica total de consumo de oxígeno (154,196,201). En base a la respuesta ofrecida por nuestra cepa nativa de *Bacillus thuringiensis*, es factible ligar la fisiología microbiana con la velocidad específica de consumo de oxígeno a través de expresiones que provengan de la concentración celular y el balance de masa en base a oxígeno. De esta manera, la velocidad específica de consumo de oxígeno podría ser estudiada en términos de las variables independientes: velocidad de impulsores, dimensiones de impulsores y la concentración de oxígeno, recordando que la velocidad de las impulsores puede ser variada fácilmente, así como que se pueden construir impulsores de diferentes diámetros y alturas y, con ello, variar las condiciones hidrodinámicas del sistema (11,15,17). El papel que juega la reología del medio de cultivo, es importante también, por lo que, su cuantificación es vital en este trabajo (23,25,51,54,67,74,75,76).

Es necesario que se pueda establecer una metodología para medir la viscosidad *in situ*, con el fin de dar una correcta interpretación a todo lo relacionado con el esfuerzo cortante sobre el metabolismo microbiano. Sabemos, de antemano, que la mayor influencia de la reología sobre la eficiencia del proceso de fermentación está en la regulación del régimen de flujo o Número de Reynolds; el cálculo de éste, permite el uso de correlaciones de mezclado disponibles que requieren de un valor de viscosidad aparente representativa de condiciones de operación *in situ*. Así pues, para el desarrollo de este trabajo experimental de Tesis Doctoral y con el fin de evaluar todos los parámetros mencionados con anterioridad, se hizo uso de todo el conocimiento encontrado en lo referente a la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*, haciendo hincapié en que, independientemente de las variables que se han mencionado, se hizo la cuantificación de otras que están relacionadas con la cinética microbiana del sistema, tales como: tiempos de mezclado, velocidad de bombeo de los impulsores, etc. Con el fin de cuantificar la reología del medio de cultivo *in situ*, se realizó un esfuerzo para su medición y dilucidar su papel en la fermentación, para dar paso a la solución de problemas que pudieran presentarse en el escalamiento del proceso.

1.4.- REVISION DE LITERATURA

1.4.1.- REOLOGIA DE MEDIOS DE FERMENTACION.

Los efectos cualitativos que se presentan en un medio de fermentación a base de una fase líquida y otra gaseosa se discuten ampliamente por Sherman (173). Estas dos fases dispersas aumentan la viscosidad aparente del medio de fermentación, ya que no son rígidas y están sujetas a un fenómeno de coalescencia así como a una redispersión, conduciendo a una suspensión de tipo No-Newtoniano, en la cual, su viscosidad aparente es sensible al esfuerzo cortante. En general, en el caso de las fermentaciones miceliales, el micelio de los microorganismos es largo y delgado, cerca de 30 micrones de acuerdo con Calderbank

(35,36). En estos casos, los medios de fermentación exhiben un nivel altamente No-Newtoniano; así por ejemplo, en el caso de aplicar la ley de potencia que se usa en reología, el índice de comportamiento de flujo (n) debería ser muy bajo. Esto ocurre debido a que los filamentos largos del sistema microbiano absorben la energía del esfuerzo cortante hasta que se alinean con los patrones de flujo y debido, así mismo, a que los remolinos que se forman son isotrópicos y en los que hay una disipación de energía turbulenta (165,174,185), la cual es abatida por el micelio. Esta misma situación, incidentalmente origina que la transferencia de masa a la fase micelial dependa de la potencia por unidad de volumen en contraste con el caso que se presenta en células individuales en una fase dispersa y que se mueven dentro de los remolinos provocados por las condiciones de mezclado. Desafortunadamente no existen expresiones matemáticas cuantitativas basadas en aspectos fundamentales que puedan aplicarse a suspensiones No-Newtonianas aún cuando se conocieran la masa y las dimensiones de las fases dispersas (104,109,111,112). Sin embargo, existen diferentes expresiones derivadas teóricamente, pero todas requieren de determinaciones empíricas que involucran dos o más constantes (33,37,39,41,45).

La literatura es muy amplia con referencia a datos sobre viscosidad de suspensiones No-Newtonianas y en donde pueden estar presentes o no microorganismos que forman micelio (5,23,30). Los resultados son dispersos, difíciles de comparar entre autores y, sin ninguna excepción, todos ellos utilizaron medios de fermentación a los cuales se les midió su reología *in vitro*, es decir, sin la presencia de aire en la muestra (116,119,168,169, 170, 172); por ello, es interesante establecer y comentar algunos conceptos. Por lo general, los datos analizados son con respecto a la relación que guarda el esfuerzo cortante con la velocidad de corte en medios de fermentación que presentan la característica No-Newtoniana y que son consistentes con respecto a la ley de potencia (23,46,62,118,137). Por otro lado, considerar las viscosidades, se observa que oscilan desde los cientos hasta varios miles de veces más altas que el agua mientras que los índices de comportamiento de flujo están por debajo de 0.3 (46, 118,137), lo cual, indica una sensibilidad No-Newtoniana al esfuerzo cortante.

En general, se sabe que la viscosidad aparente se incrementa con la concentración celular (143,144,149); este caso es más marcado en las fermentaciones miceliales en donde el micelio disperso tiene viscosidades aparentes más altas que los gránulos, mientras que los micelios largos tienen viscosidad aparente más grande que los cortos. El índice de consistencia de flujo (m) se incrementa también con la concentración celular manteniendo este comportamiento conforme la morfología del micelio cambia a partir de los pellets (164,183,184). En este caso el índice de comportamiento de flujo (n), se reporta que permanece constante conforme se incrementa la concentración celular y disminuir conforme la morfología tiende a dispersar el micelio a partir de los gránulos.

Existen objeciones fundamentales a utilizar viscosímetros rotacionales convencionales para medir la reología de un medio de fermentación, considerando que el mayor problema existe cuando los sólidos en suspensión tienden a precipitar rápidamente, o bien, a alinearse

con el movimiento del viscosímetro, lo cual es completamente diferente cuando se hace una cuantificación *in situ*. Este tipo de problema puede ser resuelto a través del uso de un impulsor que se agite durante la utilización del viscosímetro, aunque se presenta la posibilidad de analizar la distribución del esfuerzo cortante matemáticamente, sin embargo, el torque o la potencia puede ser relacionada con un número de Reynolds (166,167). Esta metodología puede ser utilizada para estimar una reología aparente del fluido considerando que el torque es una medida del esfuerzo cortante promedio en el tanque así como de que la velocidad rotacional ha sido determinada experimentalmente y de que es proporcional a la velocidad de corte promedio (35,131,175,187,190). Por ejemplo, algunos autores (25,164), utilizaron impulsores tipo turbina de seis paletas, las cuales, se anexaron a viscosímetros rotacionales y fueron capaces de caracterizar la influencia morfológica sobre la reología de medios de fermentación *in vitro*, utilizando hongos filamentosos.

Pese a lo anterior, no hay información de que se haya examinado aún la reología de un medio de cultivo No-Newtoniano en presencia de aire, a pesar de que la fase gaseosa representa de 10 a 30 % del volumen total y que debe contribuir significativamente al comportamiento reológico; por lo tanto, no existen estimaciones de las condiciones reológicas y sus interacciones con los impulsores del sistema de mezclado en un reactor biológico, por ello, sería muy importante el caracterizar los medios de fermentación *in situ* bajo condiciones de aeración y agitación definidas.

1.4.2.- INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS DEL REACTOR BIOLOGICO SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA

1.4.2.1.- TRANSFERENCIA DE OXIGENO GAS-LIQUIDO

La Bioingeniería ha mantenido un interés continuo sobre la influencia de los parámetros de un reactor biológico en lo referente a sus dimensiones y a la de los impulsores, especialmente en algunos procesos de fermentación para la producción de antibióticos, ácidos orgánicos y otros compuestos biológicos (192,194,197). Las razones para esto es la necesidad de un conocimiento para el diseño de procesos y escalamiento de los mismos, puesto que la transferencia de oxígeno y su limitación han demostrado tener importancia desde el punto de vista técnico y económico.

Considerando la importancia de la suplementación de oxígeno, la literatura también nos muestra el trabajo amplio que se ha realizado sobre la transferencia gas-líquido. Cooper et al. (1944) (50), demostraron una correlación generalizada para ver la influencia de parámetros tales como el tipo de reactor, impulsores y velocidades de flujo de gas sobre los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno, K_{La} (mMol/l-hr-atm) utilizando un sistema de oxidación de sulfito de sodio catalizado por cobre. Trabajo posterior ha sido realizado haciendo escalamiento de procesos manteniendo un equivalente del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, determinado por este procedimiento,

en reactores biológicos (4,5,98); estos éxitos, incluyeron fermentaciones miceliales (65,69,72,87).

Relacionado con lo anterior, existen algunos reportes sobre la influencia de los sólidos en suspensión y la reología No-Newtoniana sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (198,200,202,203). Algunas investigaciones sobre este punto se han enfocado en dos direcciones: sistemas modelo, en los cuales, los efectos de parámetros importantes sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en base al sulfito de sodio, pueden ser tratados separadamente (115) y sistemas reales, en los que, existen complicaciones en reactores biológicos a nivel industrial así como de medios de fermentación y que son resueltos empíricamente (134,136,139,185). A partir de estos estudios y como una conclusión general el K_{La} puede ser expresado de la manera siguiente:

$$K_{La} = K_1 (P/V_T)^A (V_s)^B (\mu_a)^\gamma$$

ecuación en la que:

K_1 = Constante de Proporcionalidad.

P = Potencia Consumida por el Impulsor.

V_T = Volumen del Tanque.

V_s = Velocidad Superficial del Aire.

μ_a = Viscosidad Aparente.

A, B, γ = Exponentes para Escalamiento

Con respecto a los consumos de energía por unidad de volumen, se puede establecer que la potencia consumida por el sistema de agitación en ausencia de aire puede ser relacionada con la que está en presencia de aire (132,133), considerando que ésta última se puede calcular en función de las dimensiones de los impulsores (132,133); sin embargo, debe especificarse que la constante de proporcionalidad (K_1) es dimensional y depende de las unidades que se utilicen. Los exponentes A, B y γ son funciones de tales parámetros dependiendo del tamaño de la escala del equipo (70) así como del método que se utilice para determinar la viscosidad aparente. Así pues, como una conclusión de esto, se puede decir que si el comportamiento del proceso de fermentación puede ser caracterizado por el K_{La} , también puede ser relacionado con los parámetros del reactor biológico, así como con la viscosidad del medio de fermentación, siempre y cuando, exista suficiente información proveniente de escala piloto.

Sin embargo, es interesante saber que existen algunos casos reportados en la literatura en los que la actividad biológica del sistema de fermentación no es dependiente exclusivamente de la capacidad del reactor biológico para transportar oxígeno al medio de fermentación. Por ejemplo, Bartholomew (1960)(13), encontró que cuando se hace una manipulación de los coeficientes de transferencia de masa gas-líquido calculados utilizando

la oxidación del sulfito de sodio, a través de hacer cambios en la velocidad de flujo de aire, se obtienen varias calidades de penicilina a diferentes velocidades de agitación, aún manteniendo el K_{La} constante.

De lo anterior, se obtiene una suposición de que utilizar el K_{La} como un criterio de escalamiento conduce al mantenimiento bioquímico similar en el medio de cultivo. lo cual produce condiciones bioquímicas similares en la superficie celular.

1.4.2.2.- TRANSFERENCIA DE OXIGENO LIQUIDO-CELULA

Esta parte de la revisión bibliográfica es importante, por el hecho de considerar de que el proceso de transferencia de oxígeno entre el líquido y la célula, podría presentar una situación similar al problema que tratamos de dilucidar, es decir, al proceso de transferencia de masa del medio de cultivo al interior de la célula.

Al respecto, se puede decir que el proceso de transferencia de oxígeno desde el medio de cultivo a la superficie celular puede ser caracterizado por cuatro resistencias a dicha transferencia (13,66,161,196). Estas resistencias se pueden expresar de la manera siguiente:

- Resistencia ofrecida por el líquido del medio de cultivo.
- Resistencia ofrecida por el líquido que envuelve a la célula.
- Resistencia intracelular.
- Resistencia a la reacción.

Cada una de estas resistencias puede ser apoyada por una explicación desde el punto de vista, ya sea fisiológico o físico. Por ejemplo, la resistencia ofrecida por el medio de fermentación es un problema que es afín a las condiciones de mezclado en el reactor biológico. En el caso de la resistencia ofrecida por la película del líquido alrededor de la célula es un problema relacionado con el esfuerzo cortante en el que el transporte convectivo del oxígeno respaldará velocidades de reacción más altas que las que se presentan en el transporte por difusión molecular. Por otro lado, la resistencia intracelular, está relacionada con la morfología microbiana, en la que el tamaño de la célula, la de los agregados que se puedan formar y la densidad del crecimiento microbiano, son las que determinan qué tanto oxígeno se puede difundir y que tan rápidamente puede ser consumido por el conjunto celular. Finalmente, la resistencia a la reacción está determinada

por la cinética intrínseca del sistema microbiano así como de su estado genético y fisiológico.

Es interesante saber que existen diferentes enfoques con respecto a estas resistencias. Por ejemplo, Jensen et al. (93), establecieron las dificultades teóricas para utilizar la velocidad de consumo de oxígeno como un parámetro para regular los niveles de aeración y agitación. Lo anterior, fue debido a que se pudo demostrar exitosamente una reproductibilidad de experimentos de nivel matraz a reactores agitados para la producción de antibióticos, sin embargo, este sistema de control podría conducir a condiciones de operación muy severas a nivel industrial por lo que el enfoque dado, desde un punto de vista general, no ofrece ninguna luz en cuanto a la solución de problemas fundamentales; por ejemplo, el que está relacionado sobre cuáles son las variables independientes que tienen influencia sobre la velocidad de consumo de oxígeno.

Con respecto a la importancia del mezclado y del fenómeno de transferencia de oxígeno líquido-célula, algunos autores han dejado en claro su importancia tanto a nivel de investigación y desarrollo como a nivel industrial (5,161,196). A partir de este conocimiento, se observa, por ejemplo, el proceso para la cuantificación de tiempos de mezclado mínimos, sin embargo, no se visualiza su efecto en el diseño de un proceso de fermentación, lo anterior, es debido a que ellos estimaron coeficientes de transferencia de masa líquido-célula a través de la medición de velocidades de disolución de urea en soluciones de glicerol y coeficientes de transferencia gas-líquido utilizando soluciones de pulpa de papel.

Con lo anterior, ellos seleccionaron una metodología de escalamiento desde nivel matraz a fermentadores de 15 litros y luego de 100 litros basados en mantener constante un coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) obtenido por el método de sulfito de sodio, así como la velocidad de disolución de urea (K_s); por lo tanto, se puede decir que estos investigadores concluyeron que con el fin de asegurar el éxito en un proceso de escalamiento se requiere mantener igual la transferencia de masa líquido-célula y la de gas-líquido, lo cual pudo ser constatado, a través de una buena reproducción en la velocidad de consumo de oxígeno durante la propagación de *Penicillium chrysogenum*.

1.4.3.- EL SISTEMA DE MEZCLADO EN UN REACTOR BIOLÓGICO

En un reactor biológico agitado, el mezclado se lleva a cabo a través de tres mecanismos distintos. En principio, la homogeneidad a un nivel molecular proviene de una difusión molecular, sin embargo, para que este fenómeno esté presente se requiere de un esfuerzo cortante a partir de los impulsores, el cual, está supeditado por la reología del medio de fermentación (27), de tal manera, que el mezclado uniforme de éste, en las diferentes zonas del reactor biológico, proviene de la capacidad de bombeo de los impulsores, lo cual, conduce a una característica de flujo que es proporcional al producto

de la velocidad de agitación por el diámetro del impulsor al cubo, concepto que puede ser aplicado a una variedad amplia de tipos de impulsores.

Con referencia a la potencia consumida por unidad de volumen, ésta puede ser relacionada con parámetros afines al impulsor mediante el Número de Potencia (166):

$$N_p = N^3 D_1^5 \rho / P.$$

ecuación en la que:

N_p = Número de Potencia (Adimensional)

N = Velocidad del Impulsor (seg^{-1})

D_1 = Diámetro del Impulsor (cm)

ρ = Densidad del Fluido (g/cm^3)

P = Potencia (Watts)

Considerando que la potencia es la energía suministrada al reactor por unidad de volumen y por unidad de tiempo, al ser dividida por velocidad de flujo se puede obtener una expresión que represente la energía disipada por unidad de volumen de fluido en términos de los parámetros del impulsor:

$$P / Q = N_p N^3 D_1^5 / kND_1^3 = (N_p / k) N^2 D_1^2$$

ecuaciones en las que:

Q = Flujo de Descarga del Impulsor (cm^3 / seg)

k = Coeficiente de Descarga del Impulsor (Adimensional)

Como se puede observar, esta expresión tiene unidades de esfuerzo cortante y representa la suma de la energía disipada como esfuerzo cortante viscoso en el flujo originado por los impulsores y la energía disipada como esfuerzo cortante turbulento. La mayor parte de este esfuerzo cortante se encuentra en forma disipada en las regiones de los impulsores. Algunos autores (131,149), han mostrado que gran parte de la energía total disipada lo hace dentro de las dos pulgadas inmediatas a las paletas para números de Reynolds de aproximadamente de 3.6×10^5 .

Debido a la complejidad de los patrones de circulación y de esfuerzos cortantes en un tanque agitado, el mezclado no ha sido todavía caracterizado en términos fundamentales

de teoría hidrodinámica aún para sistemas relativamente simples (28). Sin embargo, existen diferentes criterios prácticos para mezclado los cuales han sido utilizados para determinar la eficiencia de los parámetros de un bioreactor relacionados con el mezclado. La mayoría de estos criterios se han comparados y discutido por varios autores (68,76,140). Un criterio común para verificar cuantitativamente la calidad de un mezclado en bioreactores intermitentes es el que se conoce como el Tiempo Terminal de Mezclado, el cual se define como el tiempo requerido para distribuir un pulso de características distinguibles a través de un volumen de tanque y que puede ser determinado a través de la siguiente expresión:

$$N_M = \Theta_B (ND_1^2)^{2/3} (D_1 / H_1)^{1/2} / (N^2 D_1 / g)^{1/6} \\ (D_1 / D_T)^{3/2}$$

ecuación en la que:

N_M = Número de Mezclado, (Adimensional)

Θ_B = Tiempo Terminal de Mezclado, (seg)

N = Velocidad del Impulsor, (seg^{-1})

D_1 = Diámetro del la Impulsor, (cm)

H_L = Altura de Líquido, (cm)

D_T = Diámetro del Tanque, (cm)

g = Aceleración de la gravedad, (980 cm/seg^2)

A través de esta ecuación se ha demostrado que el tiempo terminal de mezclado puede ser correlacionado con diferentes regímenes de flujo en donde el Número de Reynolds va de 1.6 a 1.8×10^5 para el caso de fluidos Newtonianos. Otro criterio práctico para cuantificar el mezclado es el que se conoce como el Tiempo de Circulación, el cual se define como el tiempo requerido por un elemento de fluido saliendo de la zona de los impulsores, circular a través del resto del reactor y regresar otra vez a dicha zona. Algunos autores(84,130) han podido relacionar experimentalmente los parámetros de un reactor con el tiempo de circulación del fluido a través de la expresión siguiente:

$$N_c = N\Theta_c (D_1 / D_T)^2$$

en la que:

N_c = Número de Circulación, (Adimensional)

θ_c = Tiempo de Circulación, (seg)

Acerca de esta ecuación, se ha analizado una gran cantidad de datos con respecto a los tiempos de circulación y de mezclado y se ha concluido que el mezclado de un fluido se completa después de aproximadamente tres circulaciones a través de la zona de impulsores para el caso de sistemas altamente viscosos y, aproximadamente, de dos a tres circulaciones cuando los sistemas son bajos en viscosidad.

Por otro lado, se debe establecer que ni el tiempo terminal de mezclado ni el tiempo de circulación están directamente relacionados con el mezclado que está presente en la zona de remolinos cerca de los impulsores. Los parámetros que tienen mayor influencia sobre la transferencia de masa y energía en estos remolinos son precisamente la potencia por unidad de volumen y las propiedades físicas del fluido.

1.4.4.- MEZCLADO EN FERMENTADORES

Existe una gran variedad de reportes en la literatura (153, 154) en los que se menciona el problema de la presencia de zonas pobres de mezclado en reactores biológicos, aspecto que proviene de mediciones de concentración de oxígeno disuelto. Estos reportes son en base al hecho de que existan regiones en reactores biológicos en donde la concentración de oxígeno disuelto se aproxima a cero mientras que altas concentraciones que pueden oscilar hasta 60% y 70% son las que existen en la zona de los impulsores estando presente un sistema microbiano. Como resultado de un mezclado pobre se pueden originar cambios fisiológicos de importancia de tal forma que algunos autores (21,22) han mencionado que el período máximo bajo una limitación de oxígeno (5-10 %) en que puede existir un microorganismo es de aproximadamente 3 minutos. Estos resultados han sido obtenidos generalmente *in vitro*, sin embargo, no están relacionados con las condiciones de un proceso de fermentación actual. La forma para poder establecer una relación general entre las condiciones pobres de mezclado y el daño fisiológico que pudiera sufrir un microorganismo es a través de dilucidar cuál es el efecto que tiene una limitación de oxígeno sobre la cinética microbiana. Lo anterior, podría llevar al conocimiento de que hay una relación muy estrecha entre las condiciones de mezclado, el consumo de oxígeno y la eficiencia con que los componentes del medio de cultivo son utilizados para la formación de nuevas células, producto, bióxido de carbono, etc.

Es indudable que cuando el biotecnólogo se enfrenta a problemas de mezclado en reactores biológicos y, al hacer una consulta en la literatura acerca de este tema, se encuentra con que la mayor cantidad de información está relacionada con la producción de antibióticos. Por ejemplo, la mayoría de los autores que han trabajado en la determinación de tiempos de mezclado (153, 154), lo ha hecho utilizando el sistema de agregar pulsos de

un fluido a una temperatura de 50-60°C en la superficie del agua contenida en un tanque de fermentación midiendo luego el tiempo requerido para alcanzar una distribución uniforme de temperatura en varios puntos del recipiente.

Los tiempos de mezclado obtenidos de esta forma, por lo general, son satisfactorios al comparárseles con valores calculados y que están basados en parámetros tales como la geometría y las condiciones de operación en el sistema. Con respecto a antibióticos, se considera que los tiempos de mezclado por encima de 15 minutos, por lo general, afectan seriamente la producción de este tipo de compuestos en zonas con pobre mezclado, mientras que tiempos por debajo de 15 minutos afectan no solamente la producción del antibiótico, sino también la fisiología del microorganismo, y que cuando los tiempos de mezclado llegan a ser menos de 1.5 minutos podría haber efectos mecánicos en el sistema microbiano. Lo anterior, probablemente sea debido a efectos mecánicos que dañan al microorganismo y que provienen de una velocidad extrema que se requiere para obtener una uniformidad en el medio de fermentación. Estos mismos autores, han podido establecer una relación entre el Número de Reynolds del impulsor y el coeficiente

de descarga de bombeo, el cual se reduce en una relación directa al Número de Reynolds que está por debajo de 10^4 , sin embargo, no indican la forma en que se obtuvieron esos coeficientes de descarga, pero que sí son directamente proporcionales a la siguiente expresión:

$$(D_i^{0.4} \rho / \mu)^{0.5}$$

lo cual, conduce a pensar que el coeficiente de descarga es independiente a la velocidad del impulsor y que los datos provistos por estos autores son insuficientes para poder relacionar cuantitativamente los parámetros del reactor con la actividad biológica o con las condiciones de mezclado en otros reactores.

Sobre este mismo tema, es importante mencionar también que existe poca información sobre tiempos de mezclado medidos en medios de fermentación y en presencia de aire. Algunos investigadores (21,22) han utilizado suspensiones de pulpa de papel a las cuales se les asperja aire y se ha intentado establecer una correlación entre el tiempo terminal de mezclado para un determinado factor de momento en términos de la geometría del impulsor:

$$N_{mom} = N^2 D_i W H_B (D_i - W)$$

ecuación en la que:

- N_{mom} = Factor de Momento (pg^4 / seg^2)
 N = Velocidad del Impulsor (seg^{-1})
 D_1 = Diámetro del Impulsor (pg)
 W = Ancho de la Paleta del Impulsor (pg)
 H_B = Altura de la Paleta del Impulsor (pg)

Con respecto a este sistema utilizado para determinar tiempos terminales de mezclado y factores de momento en términos de geometría del impulsor, es difícil relacionar los resultados obtenidos con situaciones reales en procesos de fermentación.

1.4.5.- ESFUERZO CORTANTE EN FERMENTADORES

Todo proceso de fermentación aeróbica está siempre sometido a condiciones de mezclado y, como consecuencia de ello, a un esfuerzo cortante. Este parámetro de fermentación tiene una influencia significativa en la morfología celular, autólisis, suplementación de oxígeno, desprendimiento de bióxido de carbono y la velocidad específica de crecimiento (159).

Al analizar el esfuerzo cortante, algunos investigadores han enfocado el problema de los efectos de agitación sobre el tamaño del microorganismo (74,79,100). Así mismo, sus enfoques fueron hacia cultivos microbianos utilizando hongos filamentosos, sin embargo, algunos de ellos dejan entrever la influencia que puede tener la velocidad de corte sobre la eficiencia en el transporte de nutrientes al interior de la célula bajo un valor máximo relacionado con $N^2 D_1^2$.

1.4.6.- EL CONSUMO DE OXIGENO EN MICROORGANISMOS

Independientemente de lo que se ha mencionado con respecto a los valores bajos de consumo de oxígeno por parte de la cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, que se empleó en este trabajo, es conveniente exponer una revisión de literatura sobre este tema, en virtud de que conserva una relación muy estrecha con el consumo de sustrato y la influencia que tienen las condiciones de mezclado; es decir, se busca la alternativa de establecer un modelo de control de utilización de sustrato que pudiera tener sus orígenes en el consumo de oxígeno. Podemos decir que por largo tiempo, los investigadores llegaron a establecer que el consumo de oxígeno en los microorganismos seguía una cinética del tipo de la llamada concentración crítica (153,154). A este respecto, existe una concentración crítica de oxígeno por encima de la cual, la velocidad de consumo conserva un orden de aproximadamente cero mientras que por debajo la velocidad de consumo sigue una cinética tipo Michaelis-Menten con una constante de afinidad baja (K_M).

En términos biológicos, se ha demostrado que las oxidasas terminales tienen una

afinidad alta por el oxígeno, incluso, a niveles de 0.2 % de saturación y que las etapas posteriores en la cadena de transporte de electrones limita el estado estable de la velocidad de respiración (44,47,48,49,52). Más aún, se ha concluido que a través de un modelo multienzimático se puede explicar el pico de una curva obtenido al graficar el consumo de oxígeno contra la concentración de oxígeno disuelto.

El metabolismo del oxígeno es un fenómeno complejo y altamente regulado, ya que, existen diferentes mecanismos fisiológicos que modifican la cinética de su consumo; además, las constantes de velocidad son fuertemente influenciadas por el tipo y la cantidad de fuente de carbono que está presente en el medio de cultivo (78,79). Por otro lado, los microorganismos aeróbicos se pueden adaptar a presiones parciales de oxígeno bajas a través de una síntesis adicional de oxidasas terminales, como por ejemplo, Citocromo a_1 y/o Citocromo a_2 (79). Así pues, si la concentración de oxígeno disminuye lentamente, la velocidad de consumo tiende a permanecer constante.

Sobre este mismo punto, es menester decir que el microorganismo podría emplear una oxidasa terminal, la cual, no está sujeta a una regulación de síntesis pero que, sin embargo, parece incrementarse en actividad cuando la concentración de oxígeno cae en los niveles de una concentración crítica de oxígeno disuelto. Interesante también resulta que la fosforilación oxidativa puede desprenderse de reacciones terminales cuando los niveles de concentración de oxígeno disuelto son más bajos conduciendo a un incremento en la velocidad de consumo conforme a la concentración de oxígeno disuelto va disminuyendo (78,79). Otro aspecto importante es que la velocidad de consumo se puede incrementar ligeramente como una respuesta a las etapas de incremento en la concentración de oxígeno considerando que el estado estable de la saturación de sustrato en la cadena respiratoria siempre está dispuesta a aprovechar la ventaja de una mayor disponibilidad de sustrato, lo cual es debido a que la oxidasa terminal opera con un potencial de reducción alto y la fosforilasa opera con un alto potencial de oxidación, de tal manera que cualquier pulso en oxígeno conduce a una velocidad de consumo que rompe con el equilibrio hasta que éste es restablecido en la cadena respiratoria; pero, si la cadena respiratoria es sometida a una limitación de oxígeno por períodos cortos (5-10 seg), la velocidad de consumo inicial puede incrementarse hasta 2 ó 4 veces del valor que tenía en el estado estable (44). Finalmente, se sabe que a bajas concentraciones de oxígeno, los microorganismos requieren un tiempo determinado para realizar sus cambios en sus estados respiratorios (78,79).

De acuerdo a lo anterior, parece ser que es difícil el predecir la cinética de consumo de oxígeno, más aún cuando el proceso de fermentación es complejo. Sin embargo, sí se puede establecer que un microorganismo puede responder a un valor crítico de oxígeno disuelto pese a estar operando a un valor máximo de velocidad de consumo de oxígeno. Así, se puede decir que la mayoría de las concentraciones críticas de oxígeno disuelto oscilan entre 0.1 y 10 % de saturación, encontrándose también una diversidad en los datos de consumo específico máximo, lo cual, probablemente se deba a la dificultad de mantener una actividad total en las células bajo ciertas condiciones experimentales.

2.- PROGRAMA DE INVESTIGACION

Una vez que se constató que la cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 no demandó niveles de oxígeno como cualquier microorganismo que se propaga en un proceso de fermentación aeróbica, así como el hecho de visualizar que el mezclado pudiera ser un parámetro significativo en la eficiencia de producción de insecticidas biológicos, el presente trabajo experimental de tesis fue englobado dentro de un programa de investigación que tuvo como objetivo el conocer ampliamente el efecto de la reología del medio de fermentación así como la calidad de mezclado, en la eficiencia de la fermentación. Para ello, se consideró que el uso de diferentes tipos de impulsores podrían afectar la calidad del mezclado del medio de fermentación y, que mediante la utilización de algunas ecuaciones provenientes de los conceptos básicos de la reología, podrían proveer una herramienta para mejorar las condiciones del proceso.

Se consideró, asimismo, que los conceptos que se mencionan adelante, sirvan de base para la estructuración de un programa de investigación que permita la obtención de un proceso para la producción de insecticidas biológicos con perspectivas técnico-económicas satisfactorias, a nivel comercial.

2.1.- IMPORTANCIA DE LA VELOCIDAD DE CONSUMO DE SUSTRATO

La velocidad de disponibilidad de sustrato puede ser relacionada con los aspectos de productividad y rendimiento celular, que para el caso de bioinsecticidas, se puede traducir en cristales y esporas que conforman el complejo tóxico llamado bioinsecticida (38,124,127).

Desde el punto de vista de diseño, también se puede decir que existe una relación funcional entre el tamaño del fermentador, las dimensiones de los impulsores, la velocidad de éstos y la reología aparente del medio de fermentación, con la productividad y el rendimiento del complejo tóxico.

Sin embargo, la mayoría de las veces, resulta complicado establecer una relación entre la velocidad de consumo de sustrato y la eficiencia metabólica bajo la influencia de los diferentes parámetros de fermentación nombrados con anterioridad, si es que estos no están bien definidos a través de una cuantificación confiable.

Si consideramos el oxígeno como un sustrato, ya se ha mencionado con anterioridad que su requerimiento es bajo para el caso de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, por lo que, al visualizar la transferencia de sustrato al interior de la célula, este concepto se puede constituir como un parámetro de importancia para definir la eficiencia del proceso de fermentación en función de las condiciones de mezclado y la reología del medio de fermentación.

Desde el punto de vista anterior, la velocidad de consumo de sustrato tiene dos

ventajas: primero, que está directamente relacionada con el rendimiento y la productividad del complejo tóxico y, segundo, que puede ser evaluada en todas las etapas del proceso. Así pues, si la velocidad de consumo de sustrato pudiera definirse mejor, su utilidad de correlación con los parámetros reológicos del proceso, se vería incrementada significativamente; de esta manera, esta utilidad podría ser puesta en base de una Velocidad Específica de Consumo de Sustrato (gramos de sustrato / gramos de biomasa x hora) siendo éste un índice de la actividad biológica de las células de *Bacillus thuringiensis* obteniéndose, asimismo, una mejor medida de las influencias ofrecidas por los parámetros del reactor y de la reología del medio de fermentación sobre la actividad biológica e independiente de la concentración celular.

2.2.- EL PAPEL DEL MEZCLADO EN UN REACTOR BIOLÓGICO

En términos reológicos, se puede decir que el esfuerzo cortante y el mezclado del medio de fermentación, son parámetros hidrodinámicos que gobiernan el medio ambiente que rodea a la célula y que pueden ser determinados a través de las dimensiones de los impulsores, la velocidad de éstos y la reología del fluido. Estos parámetros determinan, de alguna manera, tanto la cantidad de energía de agitación disipada como el régimen de flujo del fluido en el cual se disipa dicha energía. Por otro lado, este régimen es importante para el valor máximo local de la energía de agitación disipada debido a que determina la localización de los remolinos turbulentos presentes en el mezclado. Así por ejemplo, si consideramos dos casos extremos como lo son un $N_{Re} > 10^6$, en este caso la energía está disipada uniformemente en los remolinos turbulentos que se encuentran distribuidos en todo el reactor, mientras que en valores de N_{Re} de 100 a 10^4 la mayoría de esta energía disipada está en los remolinos turbulentos cercano a las paletas de los impulsores. Como un resultado de esto, para una energía de agitación dada, el máximo esfuerzo cortante en las paletas de los impulsores se incrementa conforme el N_{Re} disminuye así como cuando el grado No-Newtoniano del fluido se incrementa.

La Figura 5, nos muestra la situación anterior en un reactor biológico. Aquí, se observa que el esfuerzo cortante máximo está localizado en las paletas de los impulsores; que la mayoría del flujo de las mismas, es inducido por el material que está siendo empujado por las paletas y que este flujo inducido no pasa por las regiones donde se localizan los remolinos altamente turbulentos originados por las paletas. La mayoría del fluido que proviene de los impulsores es bombeado a una velocidad constante de los impulsores y que cualquier elemento particular se somete a la experiencia de muy altos esfuerzos cortantes en estos remolinos de tal manera, que si el efecto del esfuerzo cortante requiere de consumos de energía del orden de la máxima disipada en las paletas, el efecto del esfuerzo cortante observado estaría directamente relacionado con el máximo esfuerzo cortante originado por las propelas e indirectamente relacionado con el flujo proveniente de ellas.

Ya con este conocimiento, surge la versión de un parámetro denominado esfuerzo

cortante-flujo, el cual es utilizado como un criterio de escalamiento en procesos para la formulación de detergentes (83), donde el problema consiste en alcanzar una condición de mezclado adecuado rápidamente sin que exista un rompimiento excesivo en el esfuerzo cortante del producto. Así, el esfuerzo cortante máximo se considera directamente proporcional a $N^2 D^2$, y al flujo del impulsor proporcional a ND^3 , de tal manera que se puede escribir la siguiente ecuación:

$$\text{Esfuerzo Cortante-Flujo} \propto (N^2 D^2 h \rho) / ND^3 h \propto (ND^3)^{-1} \propto N/D_1$$

en la que:

N = Velocidad del Impulsor

D_1 = Diámetro del Impulsor

Así como este parámetro (Esfuerzo Cortante - Flujo) puede ser graficado contra la concentración crítica de oxígeno disuelto, se considera, que también podría relacionarse con la concentración de sustrato durante el proceso de fermentación, para poder establecer el efecto de la velocidad terminal del impulsor sobre la calidad del mezclado (124). Este tipo de análisis ha sido realizado con éxito en la producción de antibióticos, ácidos orgánicos y enzimas (103,152,164), lo cual, sería de esperarse de llevar a cabo en un proceso como lo es el de los bioinsecticidas, en el cual, se ha insistido en que hay una relación estrecha entre las condiciones de mezclado, la reología del medio de fermentación y las condiciones de operación.

Se ha observado que en el caso de bioinsecticidas existe más de un mecanismo que afecta el rendimiento y la productividad, incluso, se ha constatado que el mezclado es importante y que su efecto no ha sido considerado ampliamente en lo publicado hasta ahora. En cualquier caso, se puede decir que el parámetro esfuerzo cortante-flujo parece ser un enfoque prometedor en la evaluación de la actividad biológica de este proceso de fermentación, debido a que su influencia sobre la eficiencia del reactor nunca ha sido reportado en la literatura. Así pues, si este parámetro fuese establecido como un factor físico que afecta la productividad biológica, representaría una contribución importante a los procesos encaminados a la producción de insecticidas biológicos y a otros compuestos biológicos provenientes de un proceso de fermentación.

Finalmente, y desde un punto de vista práctico, el Esfuerzo Cortante-Flujo puede ser una característica de un sistema de impulsores, el cual puede ser modificado en reactores que ya existan o en otros que se piense construir, de tal forma que lo que se planeó para el desarrollo de este proyecto de Tesis Experimental, puede tener una aplicación inmediata.

2.3.- REOLOGIA Y TEORIA DE LA AGITACION

2.3.1.- REOLOGIA

Los fluidos que tienden a sufrir un adelgazamiento en función de un esfuerzo cortante tienen la característica de ser de baja viscosidad a altas velocidades de corte, como sucede cuando un fluido se mueve rápido cerca de la región donde se localizan los impulsores; y de alta viscosidad a bajas velocidades de corte cuando el fluido se mueve lentamente cerca de la pared del reactor; el estudio de este fenómeno se conoce como reología (53,55,56,61). Así, para un medio de cultivo dado, la relación que existe entre la velocidad de corte y la viscosidad se obtiene mediante el uso de un Reómetro, el cual, nos permite conocer las propiedades del fluido mediante la aplicación de velocidades de corte exactas ($dv / dy, \text{seg}^{-1}$) y la medición del esfuerzo cortante ($\tau, \text{gm} / \text{cm} \times \text{seg}^2$) que resulta de dicha aplicación.

Los datos de Esfuerzo Cortante contra Velocidad de Corte casi siempre se expresan de la manera siguiente:

$$\tau = m (dv / dy)^n$$

y la viscosidad, μ ($\text{gm} / \text{cm} \times \text{seg}$), que es una medida de la resistencia al flujo, se define como: $\tau / (dv / dy)$:

$$\mu = \tau / (dv / dy) = m (dv / dy)^{n-1}$$

Como una regla general, los medios de fermentación que tienen alta concentración de sólidos en suspensión poseen valores altos de (m), el cual es el Índice de Consistencia ($\text{g} / \text{cm} \times \text{seg}^{2-n}$) y de valores bajos en (n) que es el Índice de Comportamiento de Flujo. Así por ejemplo, la diferencia en viscosidad entre la zona de impulsores (Velocidad de Corte alta) y la pared (Velocidad de Corte baja) es muy grande. Este fenómeno en fermentaciones miceliales, (m) se incrementa y (n) disminuye conforme se incrementa el peso de la biomasa seca por litro de medio de cultivo y, en casos extremos de muy alta concentración celular, el fluido que se encuentra cerca de la pared del reactor no se mueve hasta que se logra ciertos límites de esfuerzo cortante. Este esfuerzo cortante limitante es lo que se conoce como Rendimiento en Esfuerzo Cortante, τ_y ($\text{gm} \times \text{cm} \times \text{seg}^2$).

2.3.2.- AGITACION Y ENERGIA DE AGITACION

La energía de agitación, P (Watts) es un factor crucial de diseño y de economía en cualquier sistema de mezclado. Se sabe que un agitador particular imparte potencia de energía a una velocidad que es dependiente de su tipo y que está caracterizada por lo que denomina Número de Potencia (Po), el cual es adimensional e independiente del tamaño del agitador. La Potencia y el Número de Potencia están relacionados con el tamaño del

impulsor, D (m) y con la velocidad de agitación, $N(\text{seg}^{-1})$, lo cual, puede ser expresado a través de la siguiente ecuación:

$$P = P_0 \rho_L N^3 D^5$$

ecuación en la que ρ_L es la densidad del líquido. Por otro lado, la Potencia de agitación se puede relacionar con el Torque M (g x cm ²) a través de la expresión:

$$P = 2 \tau N M$$

Para la medición del Torque, la Potencia de agitación y la velocidad de agitación se hace uso de un Dinamómetro, un Multímetro y un Tacómetro, sin embargo, lo más importante de estos parámetros, es su costo a escala industrial.

El Número de Potencia depende del Número de Reynolds, el cual, se define como el cociente que hay entre las fuerzas de inercia entre las de tipo viscoso y, su expresión es como sigue:

$$N_{Re} = \rho_L N D^2 / \mu$$

En la mayoría de los fermentadores de tamaño industrial, el Número de Reynolds es grande y, en tales casos, el Número de Potencia es constante, de tal manera, que la energía de agitación expresada como potencia, se puede escribir de la manera siguiente:

$$P \propto N^3 D^5$$

Otro dato importante con respecto al consumo de energía, es que la potencia se incrementa en una proporción aproximada al número de impulsores.

2.3.3.- COMPORTAMIENTO DE FLUJO Y MEZCLADO

Otro de los aspectos importantes en un sistema de mezclado es el que se refiere a la capacidad de bombeo del impulsor, Q (m³ / seg), el cual relaciona la habilidad que tiene el sistema para circular el fluido alrededor del fermentador así como para dispersar el aire que se introduce para proveer oxígeno. La capacidad de bombeo de un impulsor está caracterizada por su Número de Flujo, Fl , y ambas se pueden relacionar a través de la siguiente expresión:

$$Q = Fl N D^3$$

Y así como P_0 , también Fl es adimensional e independiente del tamaño del impulsor.

El tiempo de circulación Θ_c (seg), es el tiempo que toma el fluido bombeado por el impulsor para pasar una vez a través de todo el volumen del tanque V (m^3) y puede quedar expresado mediante la siguiente ecuación:

$$\Theta_c = V / Q = V / F I N D^3$$

Otro parámetro importante es el que se refiere al tiempo de mezclado Θ_m (seg) y que se define como el tiempo requerido para homogeneizar el contenido de un tanque y, se ha encontrado que es proporcional al tiempo de circulación.

2.3.4.- SELECCION DEL TIPO Y TAMAÑO DE UN IMPULSOR PARA MEZCLADO Y BOMBEO EFICIENTES

Considerando que el tiempo de mezclado es proporcional al tiempo de circulación:

$$\Theta_m \propto V / F I N D^3$$

para el tamaño particular de un impulsor (D), y la velocidad de agitación (N), el tiempo de mezclado que se alcanza es inversamente proporcional al número de flujo ($F I$), mientras que la potencia de agitación ejercida es proporcional a P_o . Por lo tanto, los tiempos de mezclado más cortos a potencias de agitación menores se obtienen con impulsores con valores altos de número de flujo y valores bajos de P_o . Un impulsor bajo estas circunstancias maximiza el flujo a una potencia de agitación dada.

Una vez que se ha seleccionado el impulsor a valores fijos de P_o y número de flujo es posible seleccionar la relación de tamaño óptima del impulsor para una potencia de agitación dada y así, maximizar la capacidad de bombeo y la calidad de mezclado. De acuerdo a lo anterior, el reactor podría ser agitado por impulsores grandes girando lentamente o por pequeños girando rápidamente, manteniéndose aún a los mismos valores de potencia simplemente conservando constante $N^3 D^5$, por ejemplo $N \propto D^{-5/3}$; de tal manera que se puede escribir la siguiente ecuación:

$$\Theta_m \propto 1 / N D^3$$

lo cual, puede suceder a un determinado tamaño de reactor ($V = \text{Constante}$) y con un tamaño de impulsor particular ($F I = \text{Constante}$), y así, podemos expresar la siguiente ecuación:

$$\Theta_m \propto D^{-4/3}$$

Así mismo, para impulsores grandes, relacionados con el diámetro del reactor, nos dan una capacidad de bombeo más grande y tiempos de mezclado más cortos bajo la misma potencia de agitación que impulsores pequeños de la misma configuración o geometría.

2.3.5.- EFECTO DEL TAMAÑO DEL REACTOR SOBRE EL SISTEMA DE MEZCLADO (Scale Up)

Es importante considerar cómo va a cambiar el tiempo de mezclado en diferentes tamaños de reactor que conservan la misma geometría. A este respecto, la similaridad geométrica debe mantenerse con el fin de respaldar el diseño de reactores a gran escala puesto que Po y Fl deben ser conocidas, de tal forma que el volumen del reactor deberá ser proporcional a la longitud del impulsor al cubo, es decir, $V \propto D^3$, y así se tiene que:

$$\Theta_m \propto 1 / N$$

ya que, Fl es independiente del tamaño del equipo. Por otro lado considerando que Po es también independiente del tamaño del equipo, podríamos escribir que:

$$P / V \propto N^3 D^5 / D^3 \propto N^3 D^2$$

ecuación en la que:

P / V , es la Potencia por Unidad de Volumen (Watts / m^3) por razones prácticas, este parámetro se mantiene constante en reactores a nivel industrial con valores aproximados a $1.0 \text{ kW} / m^3$. En este caso, conforme el tamaño, caracterizado por el diámetro del impulsor (D), se incrementa, la velocidad del agitador disminuye. Así pues, si P / V es constante:

$$N \propto D^{-2/3}$$

2.4.- ESTABLECIMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL DE TESIS

Es un hecho que el medio ambiente determina la actividad biológica de un sistema microbiano en un medio de fermentación tipo No-Newtoniano que está relacionado indirectamente sólo con las condiciones que imperan en dicho medio y, en virtud de que el esfuerzo cortante y el flujo del medio de cultivo son los que gobiernan este medio ambiente, como variables de ingeniería, podrían ser consideradas como la causa física de la actividad biológica. El esfuerzo cortante y la velocidad de flujo propiciados por los impulsores son variables dependientes de los parámetros del reactor, tales como su dimensión, la dimensión de los impulsores y la velocidad de agitación, la cual es modulada por la reología del fluido (177,179,181,182). Desde el punto de vista de ingeniería se han realizado intentos por relacionar variables de fermentación directamente con la actividad biológica, lo cual se requiere por dos razones. Primero, porque los parámetros biológicos de velocidad de consumo de oxígeno y concentraciones de oxígeno disuelto críticas dependen significativamente de las variables que no son de tipo biológico y, segundo, porque el papel fundamental de la reología del fluido no ha sido bien estudiada, por lo que, el problema a resolver, a través de este trabajo de investigación, fue el relacionar los parámetros del

reactor con la actividad biológica, durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 y, cuantificar la influencia de variables de ingeniería tales como el esfuerzo cortante y la calidad de mezclado, sobre esta actividad biológica.

Más específicamente, el objetivo principal de esta investigación fue estudiar la influencia del esfuerzo cortante y la calidad de mezclado sobre la actividad biológica en función de los parámetros del reactor y la reología del medio de cultivo. Se pretende que los resultados provean un conocimiento amplio sobre el proceso de fermentación para la producción de insecticidas biológicos y que ellos contribuyan a un proceso racional para el escalamiento a nivel industrial.

Así pues, de una manera general los aspectos que se estudiaron fueron los siguientes:

- a).- Comportamiento del Consumo de Energía de acuerdo a las características de diseño de los impulsores.
- b).- Influencia de la Velocidad de Agitación sobre la velocidad de consumo de Oxígeno por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.
- c).- Influencia de las dimensiones de los impulsores sobre la velocidad de consumo de oxígeno por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.
- d).- Influencia de las dimensiones de los impulsores sobre la velocidad de consumo de oxígeno.
- e).- Los aspectos de transferencia de masa del medio de cultivo a las células.
- f).- Correlación matemática entre la transferencia de masa y los parámetros de los impulsores.
- g).- Influencia de la capacidad de bombeo de medio de cultivo por parte de los impulsores y del esfuerzo cortante, sobre la velocidad de consumo de oxígeno.
- h).- Reología y Mezclado en la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.
- i).- Aspectos Reológicos *in situ* e *in vitro*, su relación en función del consumo de energía.
- j).- Análisis de los Tiempos de Mezclado en el tanque de fermentación.
- k).- Influencia de los Tiempos de Mezclado sobre la cinética de consumo de oxígeno por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.
- l).- Ensayo para el uso de datos de planta piloto para el escalamiento del proceso en un

reactor de 10,000 litros.

- m).- La efectividad del bioinsecticida producido contra el Gusano Cogollero del Maíz (*Spodoptera frugiperda*) a nivel de campo.

3.- EQUIPO, MATERIALES Y METODOS

3.1.- MICROORGANISMO

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó una cepa nativa, aislada de larvas muertas de Gusano Cogollero del Maíz (*Spodoptera frugiperda*). Se identificó y caracterizó como *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* por el grupo de investigación en *Bacillus thuringiensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y con clave C-4 en la Colección Microbiana de la Unidad de Biotecnología del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Durango.

3.2.- MEDIOS DE CULTIVO

a).- Para el mantenimiento de la cepa, se utilizó Agar Nutritivo (Merck), realizando resiembras periódicas y manteniendo los cultivos en refrigeración a 4°C.

b).- Para la propagación del microorganismo se utilizó un medio de cultivo con la composición siguiente: Melaza de Caña de Azúcar, 20 g / l; Harina de Soya, 20 g / l; Líquido de Remojo de Maíz, 30 g / l; Carbonato de Calcio, 0.1 g / l; Agua de la Llave, 1000 ml; pH 7.0 (127). El criterio en la formulación del medio de cultivo fue que todos los ingredientes fueran grado industrial.

3.3.- PREPARACION DE SEMILLA O INOCULO

A partir de un tubo con agar nutritivo inclinado en el que se tiene un crecimiento satisfactorio de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 de 24 horas de edad, se prepara una suspensión en agua destilada estéril, la cual, se ajusta a una densidad óptica de 0.15 a 590 nm en un espectrofotómetro CE 303. De esta suspensión, se inoculan al 0.5 % v / v dos matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de caldo de soya tripticaseína (Bioxon), luego, se incuba a 30°C bajo agitación a 200 RPM en una incubadora agitadora MKX. Una vez que se logra una Densidad Optica de 0.75 a 450 nm, se considera que la semilla está lista (124).

3.4.- EQUIPO DE FERMENTACION

Se usó un fermentador con capacidad total de 20 litros y un volumen de trabajo de 9 litros, Marca Lh Engineering, Serie 2000, Jarra de Vidrio, equipado con sistemas de medición y control de pH, Temperatura, Oxígeno Disuelto, Aeración y Agitación.

Las características de construcción, son las siguientes: Tipo de impulsor: Turbina tipo Rushton; Número de impulsores: 2; Número de Paletas: 4; Altura Promedio del Líquido; 25 cm.; Diámetro del Tanque: 30 cm.; Tipo de Difusor: Un sólo agujero; Número de Mamparas: 4; Relación Ancho de Mampara / Diámetro de Tanque: 0.15.

3.5.- CONCENTRACION DE OXIGENO DISUELTO

Para la medición del Oxígeno disuelto, se hizo uso de un electrodo tipo Johnson Borkowsky, construido a base de plomo y plata, realizando la calibración mediante la determinación del cero electrónico y el 100 % mediante la aeración y agitación del medio de cultivo, sin embargo, previamente, se hizo una calibración con sulfito de sodio con el fin de obtener una mayor seguridad en la calibración. La tensión de oxígeno disuelto promedio, se obtuvo mediante la media aritmética de los valores obtenidos encima y debajo de los impulsores (127).

3.6.- PROCESO DE FERMENTACION

Una vez que el medio de cultivo se halló dentro del fermentador y éste fue propiamente esterilizado durante una hora a 121 ° C, se procedió a realizar la inoculación para dar un seguimiento del proceso durante las primeras doce horas y, después, ampliar el intervalo a cada seis horas.

El seguimiento de cada observación consiste en lo siguiente: Determinación de azúcares reductores, medición de pH, cuenta viable y observación microscópica, la cual, es decisiva en la toma de decisión para dar por terminado el proceso, una vez que se observó de un 90% a 95 % de liberación de esporas y cristales, relación que se considera 1:1. En la última observación, se incluyó la determinación de esporas (127).

3.7.- DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

Una muestra obtenida del reactor, se centrifugó y, del sobrenadante, se tomó 1 ml para hacer la determinación de azúcares reductores por el Método del Acido 3-5 dinitrosalicílico (127).

3.8.- CUENTA VIABLE DE COLONIAS POR MILILITRO

Empleando una muestra de 1 ml. proveniente de una serie de diluciones en tubos con 9 ml de solución salina al 0.85 % estéril, se sembró por duplicado mediante el método de vaciado en placa. El medio de cultivo que se uso fue agar nutritivo (Merck); la incubación de las placas se hizo a 30°C por 12 horas procediéndose luego a hacer la cuenta viable de las colonias en un cuentacolonia (127).

3.9.- CUENTA DE ESPORAS VIABLES

Para esta determinación, se siguió el mismo procedimiento que para la cuenta viable, haciendo la siguiente variación: antes de la siembra, las tres diluciones finales se sometieron a un tratamiento térmico (80°C / 10 min), con el fin de eliminar las posibles células vegetativas aún presentes (127).

3.10.- BIOENSAYOS Y PRUEBAS DE CAMPO

Los bioensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en la Sección de Entomología del CIIDIR-IPN Unidad Durango (121,122). Las pruebas de campo fueron realizadas en el Valle del Guadiana por el personal de investigación del Programa Agrícola y del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Delegación Estatal de la S.A.R.H. en Durango (121,122).

3.11.- MEDICION DE CONSUMO DE ENERGIA DE MEZCLADO

El consumo de energía por aspectos de agitación se realizó midiendo el consumo de energía en amperes o watts, haciendo uso de un multímetro (General Electric C-2010) en las terminales del motor que hace girar la flecha de agitación. Las pérdidas eléctricas y mecánicas en el motor, en la transmisión y en los sellos del reactor, fueron corregidas a través de la calibración de la potencia del motor tomando como parámetros una cierta velocidad de agitación con determinada carga (124).

3.12.- MEDICION DE LA REOLOGIA DEL MEDIO DE CULTIVO *in situ*

E in vitro

Con el fin de medir la reología del medio de cultivo durante el proceso de propagación, bajo condiciones de aeración y agitación, se adaptó un método *in situ*. Este se basa en la medición de la velocidad de los impulsores, así como en el consumo de energía de agitación . En el régimen de flujo laminar, el Número de Potencia para un impulsor de

disco tipo turbina es inversamente proporcional a su Número de Reynolds. Un factor de altura de la paleta (h), es necesario para corregir el Número de Potencia para diferentes alturas de paleta. Una expresión matemática para lo anterior, puede quedar así:

$$N_p h^\alpha = K_R N_{Re}^{-1}$$

$$P / N^3 D_i^5 \rho h = k_R \mu_a / N D_i^2 \rho$$

ecuación en la que:

N_p = Número de Potencia (Adimensional)

h = Factor de Altura de la Paleta del impulsor
($h = \text{Altura} / 0.2 D_i$)

k_R = Constante de Proporcionalidad entre el Número de Potencia y el Número de Reynolds en el Régimen de Flujo Laminar.

N_{Re} = Número de Reynolds (Adimensional)

P = Potencia (Watts)

N = Velocidad del Impulsor (seg^{-1})

D_i = Diámetro del Impulsor (cm)

α = Exponente del Factor de Altura de la Paleta del Impulsor

ρ = Densidad del Fluido (g / cm^3)

La cuantificación de todos los valores se realizaron sin ningún problema, ya sea directamente del proceso o mediante modelos matemáticos establecidos en la literatura para fluidos No-Newtonianos.

Para la cuantificación de la reología del medio de cultivo **in vitro**, se requirieron de 300 ml y se agitaron mediante el uso de un agitador magnético.

Posteriormente, con el uso de un viscosímetro tipo Brookfield LVT con sistema rotativo y con huso cilíndrico se tomaron las lecturas directamente del centro del vaso de precipitados. Antes de que se tomara cada lectura, se agitó previamente el medio de cultivo hasta obtener una muestra homogénea y que la superficie estuviera en movimiento, en ese momento, se encendió el viscosímetro, se tomó 30 segundos y se tomó la lectura. Es

conveniente tomar lecturas a dos velocidades de rotación del viscosímetro, una alta y una baja, por ejemplo, 3 y 60 RPM, posteriormente, los datos se convierten a velocidades de corte promedio, así como a esfuerzos cortantes, usando las expresiones siguientes:

$$dv / dy = 4 \pi N R_c R_s / R_c^2 - R_s^2,$$

$$\tau = m T_o / 2 \pi R_s^2 L$$

en las cuales:

dv/dy = Velocidad de Corte Promedio (seg^{-1})

N = Velocidad del huso (seg^{-1})

R_c = Radio del Vaso de Precipitados (cm)

R_s = Radio del huso (cm)

τ = Esfuerzo Cortante ($\text{g} / \text{cm} \times \text{seg}$)

m = % de la escala

T_o = Escala del Momento de Torsión ($\text{g} \times \text{cm} / \text{seg}^2$)

L = Longitud del Huso (cm)

3.13.- MEDICION DE LOS TIEMPOS DE MEZCLADO

Para la medición de los Tiempos de Mezclado se usó una solución alcalina a base de hidróxido de sodio, la cual, en un volumen de 9 litros se colocó en el fermentador y bajo las condiciones de mezclado seleccionadas, se le agregó fenolftaleína hasta observar el vire a color de rosa. El tiempo, en segundos, requerido para lograr este vire, fue el que se consideró como Tiempo de Mezclado (145).

3.14.- DETERMINACION DE PESO SECO

Para la determinación de peso seco, se consideró el criterio de utilizar el peso de una célula del género *Bacillus* que es de 3.77×10^{-12} kg (4). Para lo anterior, se emplearon los datos de cuenta viable en placa.

3.15.- DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO

Los Coeficientes de Rendimiento en base a sustrato, fueron cuantificados a través de la medición del peso seco, así como de los azúcares reductores, los cuales, se determinaron por el método del ácido dinitrosalicílico (127).

3.16.- DETERMINACION DE LA DEMANDA DE OXIGENO Y EL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO

Estos parámetros se cuantificaron utilizando el Método Dinámico, el cual, pese a que pudiese afectar el proceso de fermentación, se procedió lo más rápidamente posible. Así mismo, se consideró el efecto de la aeración superficial para efectos del Coeficiente de Transferencia de Oxígeno (70).

3.17.- DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA LIQUIDO-SOLIDO

Con el fin de poder establecer la eficiencia del transporte de material nutriente al interior de la célula, se consideró la posibilidad de establecer una ecuación que definiera esta eficiencia, la cual, podría posteriormente interpretarse en función del incremento en la concentración celular. Así pues, esta ecuación queda de la manera siguiente:

$$q_s = j (\Delta S)$$

ecuación en la que:

$$q_s = \text{Velocidad Específica de Consumo de sustrato} \\ (\text{mg S} / \text{gBM} \times \text{HR})$$

$$j = \text{Coeficiente de Transferencia de Masa} \\ \text{líquido-sólido} (\text{mg S} / \text{gBM} \times \text{HR} \times \%)$$

$$\Delta S = \text{Gradiente de Concentración de Sustrato} \\ (\%)$$

Esta ecuación puede ser usada para diferentes tipos de impulsores y velocidades de agitación y relacionarlas con el consumo de sustrato en función de la concentración de sustrato, para consolidar la hipótesis de que el Coeficiente de Transferencia de Masa es proporcional a la velocidad de flujo del medio de cultivo producido por el impulsor.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- ESTUDIOS PRELIMINARES

4.1.1.- MICROORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis*, la cual, fue aislada de larvas muertas de Gusano Cogollero del Maíz (*Spodoptera frugiperda*), identificada y caracterizada en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. como variedad *kumamotoensis*. Para efecto de clasificación en nuestra Unidad de Biotecnología, se le puso la Clave C-4 (121).

El medio de cultivo seleccionado para este trabajo, provino de una serie de estudios realizados con anterioridad (121). Destaca la presencia de la harina de soya como la fuente principal de nitrógeno y la melaza de caña de azúcar como la de carbono (122). La Tabla 3 muestra los componentes de este medio de cultivo, así como su concentración.

4.1.2.- CARACTERIZACION DE LOS IMPULSORES

El consumo de energía por agitación de tres tipos de impulsores, fue cuantificado mediante el uso de un multímetro, obteniéndose una relación entre el Número de Potencia ($P_g / N^3 D_1^5 \rho$) y el Número de Reynolds ($N D_1^2 \rho / \mu$) para los diferentes impulsores empleados en este trabajo. Esta relación se puede ver en la Figura 6. En comparación con estudios realizados en el pasado, nuestros impulsores (Altura de la Paleta = $0.2 D_1$) tuvieron un Número de Potencia de 5.0, aproximadamente, a altos Números de Reynolds. Otros investigadores han reportado valores de Números de Potencia de 6.3 (166), 5.5 (36) y 5.0 (16), sin embargo, existen pequeñas diferencias entre las características de los impulsores utilizados por ellos y las de los nuestros, sin embargo, en ambos casos, a excepción de los impulsores tipo marino, las paletas que están sujetas al disco, sobresalen $1/3$ de la longitud de la paleta. Esta característica de diseño en un impulsor, pese a que no está bien estudiado, hace suponer que haya una disminución pequeña en el consumo de energía por agitación.

Con respecto a esto último, se ha reportado que el ancho de la paleta es directamente proporcional al Número de Potencia en régimen turbulento (15); sin embargo, en el régimen laminar, el ancho de la paleta tiene menos influencia, pese a que ello no fue determinado en el presente trabajo con el fin de cuantificar este efecto. Algunos investigadores han realizado observaciones llegando a concluir que, para impulsores tipo turbina con paletas planas, el Número de Potencia tiene el siguiente comportamiento:

$$N_p \propto N_2 D_1^{2.5} H^{0.5}$$

De acuerdo a las características de nuestros impulsores tipo turbina, esta ecuación de proporcionalidad podría ser utilizada con alto nivel de confiabilidad, dándole mayor solidez a la Figura 6.

4.2.- PROCESO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DEL BIOINSECTICIDA

La Figura 7 y las Tablas 4,5,6 y 7 muestran el comportamiento clásico de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 durante su propagación a escala de planta piloto, a una temperatura de 30° C, pH 7.0, 0.5-2 VVM de aeración y 200-800 R.P.M. de agitación. Estas figuras y tablas nos muestran el número de esporas por mililitro que se pueden obtener, las cuales, se puede considerar que son directamente proporcionales al número de cristales de toxina; el comportamiento en el abatimiento de la concentración de oxígeno disuelto, los tiempos de la fase exponencial y la del proceso, así como el del pH. Se puede concluir que, el tiempo total requerido por el sistema microbiano para la formación de esporas y cristales tóxicos, oscila alrededor de 22 horas. El consumo de oxígeno(N_a) se comporta con un incremento en función del aumento en la cantidad de células presentes en el reactor, sin embargo, este consumo es mínimo ($0.70 \text{ g O}_2 / \text{LMC} \times \text{HR}$) comparado con el reportado por otros autores ($1.2\text{-}1.8 \text{ g O}_2 / \text{LMC} \times \text{HR}$) (60). Sin embargo, cuando el consumo de oxígeno es calculado en una base específica ($\text{g O}_2 / \text{g BM} \times \text{HR}$), en las mismas tablas se puede observar que la velocidad específica de consumo de oxígeno (Q_{O_2}), es constante relativamente. Con esta información, al realizarse los primeros análisis sobre la influencia de los parámetros del reactor sobre la cinética microbiana o actividad biológica, se decidió que la fase exponencial de crecimiento, tenía que ser examinada cuidadosamente, debido principalmente, a corroborar la poca demanda de oxígeno por parte del microorganismo, lo cual, representó, en principio, un gran atractivo desde el punto de vista industrial. Lo anterior, resultó interesante, más aún, cuando se sabe que la fase exponencial de crecimiento da cabida a la etapa de biosíntesis específica de masa celular más grande, lo cual, corresponde a la velocidad específica de consumo de oxígeno más alta también. En esta etapa, se puede decir también, que el estado fisiológico del microorganismo es más uniforme (105,108, 113,114).

4.2.1.- EFECTO DE LA AERACION Y AGITACION SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

Las Tablas 4,5,6 y 7, muestran el comportamiento biológico del microorganismo empleado en este trabajo de investigación. Todos los parámetros cuantificados dieron la pauta a seguir en relación a profundizar más en el conocimiento de la cepa en estudio. Los coeficientes de rendimiento ($Y_{x/s}$) muestran una capacidad metabólica aceptable de la melaza de caña de azúcar, la cual, se constituye como una materia prima importante, económicamente hablando, pues los valores de conversión, 0.50 aproximadamente, revelan

una factibilidad económica satisfactoria de poder industrializar los resultados obtenidos. Por otro lado, los valores en la demanda de oxígeno (N_a) y en la velocidad específica de consumo de oxígeno o coeficiente de respiración (QO_2), también son dignos de considerarse como un argumento atractivo de escalamiento del proceso a nivel comercial. Todo ello, aunado a los resultados que se han obtenido con el bioinsecticida a nivel de campo durante los últimos cinco años (127).

Así mismo, estos resultados permitieron considerar las posibilidades de realizar estudios sobre la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 bajo diferentes concentraciones de saturación de oxígeno a dos velocidades de agitación.

4.2.2.- INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION SOBRE LA CINETICA DE CONSUMO DE OXIGENO DE *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

La Figura 8, nos muestra la relación de la concentración de oxígeno disuelto, en porcentaje de saturación con referencia al aire, con respecto a la velocidad específica de consumo de oxígeno, en $mg\ O_2 / gBM \times HR$ para impulsores tipo Rushton de 10 cm de diámetro, girando a 450 y 700 rpm. Para el primer nivel de velocidad, uno puede ver inmediatamente que la velocidad específica del consumo de oxígeno tiene un comportamiento similar a la cinética convencional de Michaelis-Menten, es decir, que este parámetro se incrementa desde un principio a bajas concentraciones de saturación de oxígeno, consideradas a ser limitantes de la velocidad de crecimiento microbiano.

Así, resulta interesante que estos datos nos indiquen que a una concentración de 50% de saturación, sea requerida para alcanzar la mitad de la velocidad específica de consumo de oxígeno. Los resultados presentados en esta figura con respecto a este nivel de agitación, provienen de tres fermentaciones con una densidad celular de 2 a 5 gBM / LMC.

Cuando la velocidad de agitación se incrementa a 700 rpm, se observa que el comportamiento es reproducible. En este caso, se realizaron tres fermentaciones también y la densidad celular alcanzó niveles hasta de 8 gBM / LMC, sin embargo, lo más importante es el concluir que la relación es muy buena e independiente de la concentración celular, deduciéndose que lo que permitió alcanzar una mayor concentración celular, fue la transferencia de masa.

Al analizar la influencia del incremento en la velocidad de agitación, podemos asegurar que la consecuencia más importante desde el punto de vista biológico, es que la concentración de oxígeno disuelto a bajos niveles, asegura el logro de una actividad biológica satisfactoria. Por otro lado, como ya se indicó, se logra vencer una resistencia significativa a la transferencia de masa entre el medio de cultivo y las células presentes. Como un resultado de todo esto, se puede decir que la transferencia de oxígeno del gas a la fase

líquida y de ésta, a la célula, no es un aspecto importante para el proceso de fermentación, como sucede en la mayoría de los de tipo aeróbico, sino que, existe otro de mayor importancia, como lo es la transferencia de masa al interior de la célula. Sin embargo, en la propagación de *Bacillus thuringiensis*, para la producción de bioinsecticidas no existe un conocimiento que haya sido publicado en el que se denote la influencia de los impulsores sobre este fenómeno de transferencia.

4.2.3.- INFLUENCIA DE LA DIMENSION DEL IMPULSOR SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO POR *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

Después de haber establecido que la velocidad de agitación tenía un efecto significativo sobre la transferencia de masa y no sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno, se consideró apropiado averiguar la influencia de otra dimensión del impulsor sobre este último parámetro, con el conocimiento de que la dimensión más importante de un impulsor es su diámetro, utilizando para ello, uno de 7.0 cm de diámetro y 1.5 cm de altura de paleta.

En este caso, la cinética específica de consumo de oxígeno con respecto a la concentración de oxígeno disuelto obtenida a 500 y 700 rpm, se muestra en la Figura 9. Estos datos provienen de dos fermentaciones con densidad celular entre 3 y 6 gBM / LMC, obteniéndose resultados cualitativamente similares a aquellos obtenidos cuando se utilizó el impulsor de 10 cm de diámetro con altura de paleta de 2.0 cm pero, con pendientes cuantitativamente diferentes que demuestran que la cinética es dependiente del tamaño del impulsor.

Con respecto a lo anterior, se puede establecer que el diámetro del impulsor y la altura de su paleta, juegan un papel importante en lo que se refiere a su capacidad de bombeo, conduciendo a similitudes cualitativas, pero a diferencias cuantitativas que manifiestan la necesidad de una optimización en las dimensiones generales de los impulsores con respecto a las del reactor.

Algunos autores (15,23,30,62,79,142,143), han enfocado este tipo de conocimiento a la optimización de procesos de fermentación, especialmente cuando se tienen fluidos tipo No-Newtoniano, sin embargo, la mayoría de ellos, tienden a resolver problemas de transferencia de oxígeno haciendo notar que las alturas menores de las paletas de los impulsores conducen a velocidades específicas de consumo de oxígeno más bajas a las mismas concentraciones de oxígeno disuelto. Lo anterior, representa una alternativa de estudio detenido cuando se tiene como criterio principal la transferencia de masa.