

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

OBTENCION DE GLUCONATO DE SODIO  
POR FERMENTACION EN SISTEMA CONTINUO

Trabajo de Tesis

Roberto Pedro Daguerre

- 1966 -

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

OBTENCION DE OLUCONATO DE SODIO  
POR FERMENTACION EN SISTEMA CONTINUO

Trabajo de Tesis presentado por:

Roberto Pedro Daguerra

Para Optar el Título de

Doctor en Química (Orientación Tecnológica)

Año 1966

0-0-0-0-270

A MIS PADRES

Señor Decano.

En cumplimiento de las disposiciones vigentes cumpro en elevar a su consideración, y por su intermedio a la de los Señores Profesores, el presente trabajo de tesis.

Quiero dejar constancia de mi agradecimiento al Dr. Rodolfo J. Ertola por la acertada elección del tema como por su constante asesoramiento durante la ejecución del mismo. También es mi deseo reconocer la constante ayuda prestada durante la ejecución del trabajo y las indicaciones y sugerencias en la redacción de esta tesis a los Dres. Luis A. Mazza, Antonio P. Balatti y Julio E. Donato y a los Lics. Rita F. de Schuttenberg y Carlos M. Cusvas.

Agradezco asimismo al Dr. Enrique Pereira y al Ing. Oscar Garcé por el asesoramiento técnico prestado para la modificación y construcción de equipos y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo económico.

INDICE GENERAL.

PARTE GENERAL.

CAPITULO I

INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE EL ACIDO GLUCONICO Y SUS SALES.  
Toxicidad. Acción secuestrante. Reactividad química.  
Aplicaciones industriales del ácido glucónico y sus sales.

PROCESOS DE OBTENCION DE GLUCONATO DE SODIO POR FERMENTACION

MECANISMO DE FORMACION DE ACIDO GLUCONICO.

FUNDAMENTOS DEL SISTEMA CONTINUO. Cinética.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO II

ESTUDIO DEL PROCESO EN SISTEMA DISCONTINUO. Microorganismo y medio de mantenimiento. Técnicas. Equipo e instrumental. Condiciones operativas. Curva de microorganismo. Constante de velocidad de crecimiento.

CAPITULO III

EXPERIENCIAS EN SISTEMA CONTINUO. Influencia de la velocidad de dilución. Cálculo de rendimiento. Interpretación de resultados.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES FINALES. Nomenclatura.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA.

## PARTE GENERAL

### CAPITULO I

#### INTRODUCCION

La obtención de gluconato de calcio por fermentación fúngica es un proceso bien conocido. La sal de sodio, que ha superado recientemente en importancia industrial a la anterior, puede ser preparada a partir de la cálcica por reacción química, pero es mucho más conveniente hacerlo por proceso fermentativo directo. La cita bibliográfica existente sobre este último proceso se refiere únicamente a la obtención en sistema discontinuo o semi continuo (5), no existiendo datos sobre el sistema continuo.

El objeto de la presente tesis es el estudio de la producción de gluconato de sodio en sistema continuo, en una etapa. Como era necesario contar con datos del proceso, se comenzó por considerar previamente el sistema discontinuo estudiando la influencia de los medios y el pH.

### GENERALIDADES SOBRE EL ACIDO GLUCONICO Y SUS SALES

El ácido glucónico fué aislado por primera vez por BOUTROUX (65) (57) de un proceso para la obtención de ácido láctico. Aproximadamente 50 años después se comenzó a producir en escala industrial por procesos fermentativos.

El ácido glucónico o pentahidroxycaproico ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $(\text{CH}_2\text{OH})_4\text{COOH}$ ), (P.M.196,16) se expende en soluciones al 50%, dado que su obtención como producto sólido es sumamente costosa. Al estado puro es un producto cristalino, blanco e inodoro. En solución acuosa está en equilibrio con la gamma y delta lactona, dependiendo la composición de la concentración y de la temperatura de la solución.

La delta-lactona (P.M.178,14) se obtiene por cristalinización de soluciones acuosas de ácido glucónico (52). En agua se hidroliza parcialmente a ácido glucónico con disminución gradual de pH (57) (39).

Las propiedades físicas del ácido glucónico y derivados se muestra en la Tabla I (57) (39).

#### Toxicidad:

El ácido glucónico y algunos de sus derivados presentan baja toxicidad. Así, para la disolución de cálculos renales se puede suministrar ácido glucónico en la dieta diaria sin que se noten disturbios en los órganos digestivos tanto animales como humanos. El ácido glucónico y su sal de amonio son eficaces para disminuir el pH en la orina humana sin que se no-

TABLA I.

Nombre	Fórmula	Punto de Fusión °C	Solubilidad (+)	
			Agua	Alcohol
Acido Glucónico	$C_6H_{12}O_7$	131	muy soluble	ligeramente
Delta-lactona	$C_6H_{10}O_6$	153	5,9	1,0
Gluconato de amonio	$NH_4C_6H_{11}O_7$	Descomp. a 154	31,5	poco
" calcio	$Ca(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot H_2O$	- - - - -	3,5	insoluble
" cobre	$Cu(C_6H_{11}O_7)_2$	- - - - -	30,0	insoluble
" ferroso	$Fe(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot H_2O$	- - - - -	8,5 (100°C)	poco
magnesio	$Mg(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot H_2O$	Descomp. a 120	16,0	ligeramente
manganeso	$Mn(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot 3H_2O$	- - - - -	10,6	insoluble
potasio	$KC_6H_{11}O_7$	Descomp. a 180	ligeramente	insoluble
sodio	$NaC_6H_{11}O_7$	- - - - -	59,0	insoluble

(+) en g/100 ml de solución a 25°C.

ten cambios patológicos renales (13) (27). Conclusiones semejantes se han obtenido con la lactona(27) en lo que se refiere a irritación gástrica, siendo tolerable en pequeñas dosis diarias (63). En solución al 0,25 M, el ácido glucónico es menos irritante y tóxico que otros ácidos.

Propiedades semejantes presentan algunas de sus sales (17) (45) (4) cuyo uso en la industria farmacéutica y alimenticia se detalla más adelante.

#### Acción secuestrante:

El ácido glucónico y sus sales alcalinas se caracterizan por formar iones complejos solubles en cantidades variables de ión metálico e ión gluconato, formando quelatos muy estables. Se ha comprobado especialmente esta propiedad con gluconato de sodio y se han hecho estudios comparativos de esta sal frente a tetrafosfato de sodio, citrato de sodio y la sal sódica del ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) (57). La eficacia del gluconato de sodio como secuestrante en medio alcalino es superior a la acción de los compuestos mencionados, fundamentalmente para los iones calcio, magnesio e hierro (54). También se han efectuado estudios sobre otros iones tales como aluminio, cobalto, manganeso y zinc, siendo en este caso el ácido glucónico o su sal sódica, menos efectivos que los otros agentes mencionados anteriormente.

Parker (44) estudio la corrosividad sobre hierro y estaño con soluciones de ácido fosfórico, tar-

tátrico, cítrico y glucónico, siendo este último el que provocaba la menor pérdida de peso. En Pfizer (53) (57) se efectuaron ensayos sobre acero inoxidable 316, aleación Monel, cobre, aluminio, zinc y acero dulce con soluciones de ácido acético, fosfórico, glucónico, glicólico, láctico y fórmico, demostrando que el ácido glucónico presentaba una acción corrosiva menor que los otros ácidos ensayados.

#### Reactividad química:

Aunque es de poca aplicación en el campo de la síntesis orgánica, con el ácido glucónico se pueden efectuar reacciones propias de los grupos carboxilos y carbinolos. Así, se puede obtener el ester fosfórico del ácido glucónico (61); por acetilación producidos diversos derivados (40), existiendo también patentes para la obtención de derivados con ureidos y aminas no saturadas (67), amidas aromáticas estables (49), aminas alifáticas terciarias (20) efedrina (66) y naftil-amina (12). También numerosas patentes mencionan la obtención de sales inorgánicas por síntesis, tales como calcio (51) (60) ceramio (11), aluminio (38), titanio (69), antimonio (58) y otros metales (59).

#### Aplicaciones industriales del ácido glucónico y sus sales:

El ácido glucónico y sus derivados han encontrado múltiples aplicaciones tanto en la industria farmacéutica como en la alimentación y en la indus-

tria química en general.

Uso farmacéutico: El gluconato ferroso y el fosfogluconato ferroso son útiles para el tratamiento de anemias (68), (28), (16) en individuos que no toleran sulfato ferroso. El gluconato de calcio es un excelente agente para el tratamiento de hipocalcémias (27) y como componente para inyecciones de cumarina para niños espásticos (6). Junto con el gluconato de magnesio se lo aplica como ingrediente de dentífricos (48). El gluconato de potasio es más tolerable que el cloruro de potasio para el tratamiento de hipopotasemias en diabéticos (3). También tienen aplicación farmacéutica otras sales como gluconato de efedrina (66), mono-alil-ureído del ácido glucónico (67) y gluconato de antimonio (32) entre otros, por ser menos irritante y menos tóxicos.

Uso en alimentos: La delta-lactona es útil en panificación pues favorece la liberación gradual de anhídrido carbónico dando un producto de mayor uniformidad (35). También hay suplementos alimenticios que incluyen gluconato de calcio, eficaces para prevenir diarreas en terneros (12).

Uso en la industria química: El ácido glucónico, la delta-lactona y el gluconato de amonio se emplean en la industria textil (4) como catalizadores ácidos para el teñido en procesado de colorantes a la tina. También los dos primeros se usan como catalizadores en el tratamiento de resinas coloidales en la misma industria; tienen la gran ventaja de ser i

nodoros y no tóxicos. En mercerización de telas el gluconato de sodio actúa como secuestrante de hierro evitando la contaminación de telas por este metal.

En el campo de los detergentes el ácido glucónico y su sal sódica no permiten la deposición de incrustaciones especialmente cuando se trabaja con aguas relativamente duras (18). En la industria láctea también presentan esta propiedad como agentes limpiadores, teniendo la ventaja sobre los otros de no permitir el desarrollo de olores desagradables en botellas y tarros de leche (46),(47)(32).

En el grabado de aluminio se aprovechan las propiedades secuestrantes del ácido glucónico el cual evita la deposición de costras duras y adherentes en dicho metal y en el equipo (41) (19). La misma propiedad se aprovecha para el lavado de equipos en la industria de cervecería (18).

Los cueros blancos, poco resistentes al agua, mejoran dicha propiedad cuando al tratamiento se agregan gluconatos (50) que evita la precipitación de hidróxidos de aluminio.

Para la perforación de pozos en terrenos calcáreos se suele emplear ácido glucónico (en lugar de clorhídrico), el que además de ser neutralizante es secuestrante, evitando la precipitación de hidróxido de hierro y aluminio (65).

Además de las aplicaciones ya mencionadas, tanto el ácido glucónico como la lactona y sus sales, presentan otros usos industriales en el campo

de la fotografía, litografía (72) (68), galvanoplastia (9) (10), en la industria de los almidones (24) y de la pintura (43).

PROCESOS DE OBTENCION DE GLUCONATO DE SODIO POR FERMENTACION

Desde el descubrimiento del ácido glucónico - hasta nuestros días se ha comprobado que el mismo es producido por gran cantidad de hongos y bacterias. Entre los primeros los más comunes pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* y entre las bacterias las más importantes pertenecen al género *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Phytomonas*.

Ambos procesos, empleando hongos y bacterias, han sido estudiados intensivamente, siendo en la actualidad la fermentación fúngica (*Aspergillus niger*) la de mayor importancia industrial. Las cepas de *Aspergillus niger* en general producen ácido glucónico, cítrico y oxálico, dependiendo la formación de cada uno de éstos de la composición del medio, del pH y de la especificidad de la cepa (21). El efecto del contenido de nitrógeno en el medio para la obtención de los distintos ácidos depende del pH. Así, bajo contenido de nitrógeno favorece la aparición de ácido glucónico en presencia de un agente neutralizante, pero en medio ácido la aparición de glucónico se favorece con alto contenido de nitrógeno. Desarrollando micelio en presencia de poco nitrógeno se produce ácido cítrico, especialmente en la segun

da fase. Con baja concentración de minerales, preponderantemente se forma ácido oxálico. En cuanto a la especificidad, hay cepas de Aspergillus niger que producen altos rendimientos en ácido glucónico conservando su estabilidad aún luego de varios trasplantes.

Existen numerosas citas bibliográficas sobre la producción de gluconato de calcio (56), no siendo así sin embargo para la obtención de gluconato de sodio. Blom (5) menciona la obtención de este último producto en planta piloto. Para tal fin dispone de una cepa de Aspergillus niger NRRL-3 y trabaja con medios que contienen desde 24 a 35% de glucosa a la que se agrega macerado de maíz y sales en proporciones adecuadas. Emplean un inóculo de desarrollo vegetativo del hongo de veinticuatro horas, recomendando un volumen de 10% del volumen a fermentar. La fermentación se efectúa a 33<sup>o</sup>-34<sup>o</sup>C en fermentador de acero inoxidable de 0,60 m. de diámetro y 4 m. de altura, trabajando a presión con lo que se logra mayor utilización de glucosa y menor formación de espuma. El pH es mantenido automáticamente a  $6,5 \pm 0,5$  por agregado de hidróxido de sodio concentrado. Los problemas de espuma fueron solucionados con octadecanol al 1% en etanol. Después de un período de retardo de cinco a siete horas el sistema entra en la etapa logarítmica, consumiéndose la glucosa a una velocidad de 15 g/l.h. hasta que se llega a 1 g/l de glucosa remanente.

Con esta misma fermentación también se efectúa

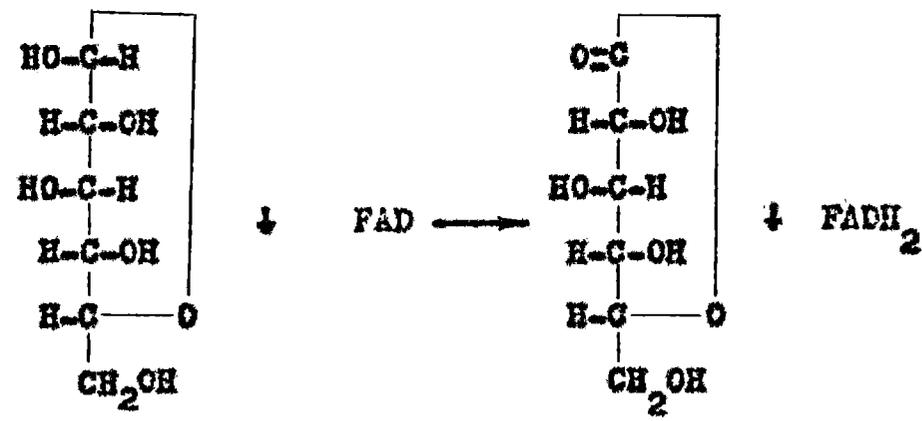
tuaron ensayos de reutilización de micelio, eliminando de esta manera el período de inducción y logrando una velocidad semejante a la ya mencionada durante todo el proceso.

Blom estudió distintas variables relacionadas a esta fermentación; entre ellas comprobaron que algunos antiespumantes tenían acción sobre el sistema enzimático del microorganismo (aceite de soja); que la estabilización discontinua (15-30 minutos a 121°C y pH 4,5) disminuía el problema de espuma y que un inóculo hecho con desarrollo vegetativo era superior a un inóculo de esporos. El aumento de agitación, aereación y presión son favorables, pues aumentan la velocidad de utilización de glucosa. En este trabajo además se dan datos de estimación de costos para una planta completa en la que se incluye la etapa de recuperación de gluconato de sodio.

#### MECANISMO DE FORMACION DE ACIDO GLUCONICO

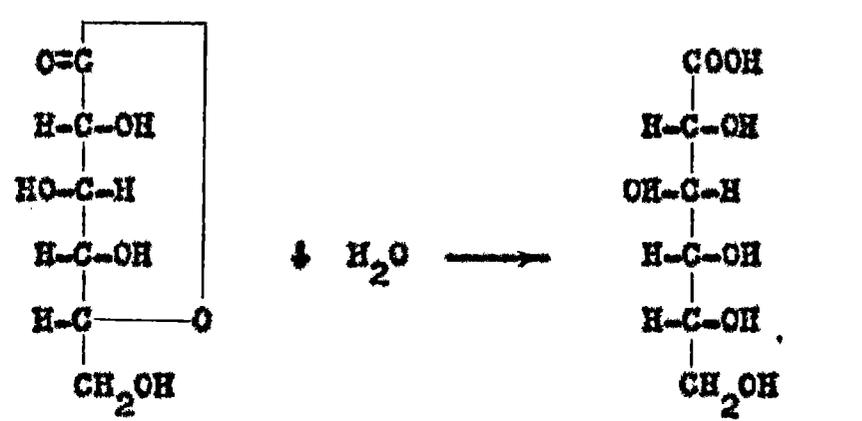
El ácido glucónico se produce por la oxidación de la glucosa en condiciones aerobias. El proceso es catalizado por una enzima intracelular comúnmente denominada glucosa-oxidasa; Keilin y Hartree (36) demostraron que esta enzima es la flavin-adenina-dinucleótido (FAD) y que no se trata de una glucosa oxidasa, sino de una dehidrogenasa (glucosa-aerodehidrogenasa) (37) que es capaz de separar hidrógeno y utilizar el oxígeno como aceptor de

hidrógeno formando agua oxigenada. Como producto intermedio se forma gluconolactona que por hidrólisis produce ácido glucónico. La secuencia de reacciones se puede formular como sigue:



Glucosa

Gluconolactona

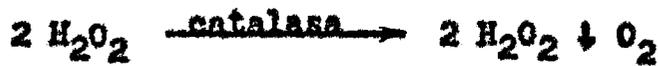


Ácido glucónico

regenerándose la enzima en la siguiente forma:



El peróxido de hidrógeno a pesar de ser un energético microbicida no afecta al *Aspergillus niger* debido a que la enzima catalasa, por él producida, la descompone a medida que se va formando:



Empleando

Empleando agua con oxígeno pesado se demostró (2) que los átomos del oxígeno del agua oxigenada producidos en la oxidación de la glucosa son derivados del oxígeno molecular, por lo cual se dedujo - que la dehidrogenasa cataliza la transferencia del hidrógeno desde la glucosa al oxígeno.

En cuanto a la presencia de gluconolactona - también ha sido demostrada por medidas polarimétricas (2), en reacciones en que se comparaba la velocidad de oxidación de la glucosa y la formación de ácido glucónico en presencia de glucosa-aerodehidrogenasa. Se comprobó que la lactona pasa a ácido simplemente por hidrólisis, sin que exista una acción enzimática intermedia.

También se ha demostrado que los citocromos no intervienen en la oxidación de glucosa (36).

Franko (23) estudió la cinética de oxidación de la glucosa en presencia de la enzima, estableciendo que el pH óptimo para esa reacción es de 6,0. Forster (22) recalca el hecho de que para el proceso fermentativo el pH óptimo es de 5,0 y explica esto admitiendo que lo que se mide es el pH del medio y no el del interior de la célula que posiblemente sea de 6,0 y que además puede depender del tipo de microorganismo utilizado. Humphrey (29) sostiene que la etapa controladora es la velocidad de hidrólisis de la lactona, la cual a su vez depende del pH. Foster sostiene en cambio que después de seleccionar el microorganismo y el medio, una vez que aquel ha desarrollado, la eficiencia dependerá de

la saturación del sistema biológico por el oxígeno. Tsao y Kempe (70) llegan también a la misma conclusión de que la solubilidad del oxígeno es la etapa controladora, trabajando con Pseudomonas ovalis.

#### FUNDAMENTOS DEL SISTEMA CONTINUO

El estudio del sistema continuo exige el conocimiento previo de la cinética del proceso, hecho que ha sido considerado en varios trabajos. Los mismos han permitido desarrollar una teoría que si bien es limitada, respecto a otros procesos químicos, es útil desde el punto de vista práctico. La limitación se debe a que los mecanismos de los procesos microbiológicos no están aclarados en la mayoría de los casos debido a su complejidad.

#### Cinética:

El estudio de la cinética puede efectuarse tanto en sistema continuo como en discontinuo; en general en procesos fermentativos este último sistema es el que más se ha empleado.

El desarrollo teórico existente en la actualidad en fermentaciones concuerda bastante bien con los datos prácticos obtenidos en laboratorio con bacterias y levaduras. En un cultivo en sistema discontinuo, si se representa la concentración celular en función del tiempo, generalmente se obtiene una curva sigmoide (25). La expresión matemática de la etapa logarítmica es la siguiente:

$$\frac{dx^0}{dt} = k^0 \cdot x^0 \quad (1)$$

donde:

$dx^0/dt$  = velocidad de crecimiento de microorganismo.

$x^0$  = concentración de microorganismo.

$k^0$  = velocidad específica de crecimiento.

La integración de esta expresión da:

$$\ln \frac{x^0}{x_0^0} = k^0 \cdot t \quad (2)$$

por lo tanto:

$$x^0 = x_0^0 \cdot e^{k^0 \cdot t} \quad (3)$$

$$k^0 = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{x^0}{x_0^0} \quad (4)$$

donde:

$x_0^0$  = concentración inicial de microorganismo.

En la ecuación (4),  $k^0$  se considera constante, lo cual es correcto sólo cuando todo el sustrato necesario para el crecimiento está presente en exceso y la temperatura se mantiene constante (30). Monod (42) demostró que la relación existente entre  $k^0$  y la concentración de sustrato fundamental para el crecimiento es de tipo hiperbólica, siendo  $k^0$  proporcional a la concentración de sustrato cuando ésta es baja y llegando a un valor de saturación con alta concentración de sustrato. Es decir:

$$k^0 = k_M^0 \frac{x^S}{K_S + x^S} \quad (5)$$

donde:

$X^S$  = concentración de sustrato.

$k_m^0$  = constante de velocidad de crecimiento (es decir, el valor máximo de  $k^0$  a niveles de saturación del sustrato limitante).

$K_s$  = constante característica del microorganismo y del sustrato y que numéricamente es igual a la concentración de sustrato cuando:

$$k^0 = \frac{1}{2} k_m^0$$

También existe una relación simple entre crecimiento de microorganismo y utilización de sustrato, en la que el primero es proporcional al segundo:

$$\frac{dX^0}{dt} = - Y \frac{dX^S}{dt} \quad (6)$$

donde:

$Y$  = constante de rendimiento.

Conociendo las tres constantes  $k_m^0$ ,  $K_s$  e  $Y$  se puede obtener una descripción cuantitativa completa del ciclo de crecimiento de un cultivo en sistema discontinuo. Esas mismas ecuaciones y constantes se pueden aplicar al tratamiento teórico del sistema continuo (30).

En general, en un proceso fermentativo, el crecimiento de microorganismo (como así también la formación de producto cuando éste está asociado a crecimiento) tiene un período inicial en el que prácticamente no hay desarrollo, es decir, un período de inducción (26) al que sigue una etapa de rápido crecimiento que finaliza con una disminución también rápida o paulatina de la velocidad de crecimiento. La

representación gráfica de la concentración de microorganismo  $X^0$ , contra el tiempo  $\theta$ , da la curva característica de las reacciones autocatalíticas, es decir, aquellas en las que el producto formado cataliza la reacción, incrementando la velocidad con el tiempo.

Cuando se quiere trabajar en sistema continuo el mismo se inicia como sistema discontinuo y cuando se llega a algún punto de la curva de crecimiento se comienza el sistema continuo por el agregado de medio fresco, manteniendo el volumen constante. Por medio de un balance de materia en el que se incluyen los parámetros cinéticos obtenidos anteriormente se pueden determinar las condiciones que se necesitan para el sistema continuo.

$$\left[ \begin{array}{l} \text{Reactante} \\ \text{que ingresa} \\ \text{con la} \\ \text{carga.} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{l} \text{Reactante} \\ \text{que se con-} \\ \text{vierte en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{l} \text{Reactante} \\ \text{que sale} \\ \text{del reac-} \\ \text{tor.} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{del reactan-} \\ \text{te en el re-} \\ \text{actor.} \end{array} \right] \quad (7)$$

Este balance se aplica tanto a microorganismo, como a sustrato o producto. En el caso de microorganismo será:

$$FX_0^0 + k^0 X^0 V = FX^0 + V \frac{dX^0}{d\theta} \quad (8)$$

donde:

$X_0^0$  = concentración de microorganismo en la alimentación.

$X^0$  = concentración de microorganismo en el reactor.

$F$  = caudal volumétrico de alimentación del medio.

$V$  = volumen del medio contenido en el reactor.

$\theta$  = tiempo.

$\frac{dX^0}{d\theta}$  = variación de la concentración de microorganismo con el tiempo.

Dividiendo la ecuación (8) por  $V$  y despejando  $\frac{dX^0}{d\theta}$  resulta:

$$\frac{dX^0}{d\theta} = \frac{F}{V} X_0^0 + k^0 X^0 - \frac{F}{V} X^0 \quad (9)$$

$$\frac{dX^0}{d\theta} = \frac{F}{V} X_0^0 + X^0(k^0 - \frac{F}{V}) \quad (10)$$

En la ecuación (10),  $\frac{F}{V} X_0^0$  es cero, puesto que  $X_0^0$  es igual a cero en los reactantes que ingresan con la carga. Por lo tanto:

$$\frac{dX^0}{d\theta} = X^0(k^0 - \frac{F}{V}) \quad (11)$$

En operación continúa cuando el sistema entra en régimen, la concentración de microorganismo  $X^0$ , no varía con el tiempo, es decir, su valor es cero, por lo tanto:

$$\frac{F}{V} X^0 = k^0 X^0 \quad (12)$$

$$\frac{F}{V} = k^0 \quad (13)$$

El término  $F/V$  es una característica importante de los reactores continuos. Normalmente el volumen de reacción  $V$  es una variable que se mantiene constante, por lo que en esta relación lo único que generalmente se modifica es el caudal volumétrico del medio. La relación  $F/V$  se denomina velocidad o

relación de dilución, D:

$$\frac{F}{V} = D \quad (14)$$

La velocidad de dilución se puede definir como el caudal volumétrico por unidad de volumen de reacción. En los sistemas continuos la velocidad de dilución es una medida de la velocidad de reacción (84) y la igualdad  $D = k^0$  determina la condición - que debe cumplirse en el sistema continuo cuando se establece el régimen. Los valores de D están condicionados por los valores de  $k^0$  y nunca deben superar el valor dado por la ecuación (5), tal como lo demuestran Herbert y col. (30). Sobrepasando esta velocidad de dilución crítica  $D_c$ , la cantidad de microorganismo que sale del sistema es superior a la cantidad de microorganismo que se reproduce en el sistema, por lo que la concentración comienza a disminuir poco a poco hasta anularse completamente, deteniéndose la reacción (lavado de microorganismo).

El tiempo de retención está dado por la inversa de la velocidad de dilución:

$$\theta_r = \frac{1}{D} \quad (15)$$

Estrictamente, es el tiempo de retención medio (15), puesto que las partículas no permanecen todas el mismo tiempo en el reactor.

En los sistemas continuos también es común incluir el rendimiento efectivo, que está dado por la relación entre microorganismo formado (o glucosa consumida) y sustrato agregado:

$$Y_E^p = \frac{DX^p}{DX_0^s} \quad (17)$$

donde:

$Y_E^p$  = rendimiento efectivo.

$DX^p$  = velocidad de transformación de la glucosa consumida.

$DX_0^s$  = velocidad de ingreso del sustrato (glucosa).

El valor de  $Y_E$  es siempre menor que la constante de rendimiento  $Y$ , cuando el valor de la velocidad de dilución es mayor que cero, debido al sustrato que sale del equipo sin reaccionar.

Uno de los aspectos más importantes en sistemas continuos es el camino que debe seguir el material a reaccionar. Danckwerts (15) considera que lo que mejor describe a un reactor es la distribución de los tiempos de residencia de partículas o moléculas que pasan por el equipo (por tiempo de residencia de una partícula se extiende el tiempo que permanece la misma en el reactor, medido en el momento en que ingresa hasta que sale del equipo).

Las comparaciones se han efectuado sobre dos tipos de reactores; uno es el tanque con mezclado total en el cual las partículas que ingresan se dispersan instantáneamente y en forma uniforme y el otro es el reactor tubular con "flujo pistón" en el que las partículas ingresan y se desplazan juntas como si formaran un pistón, considerando a estos ejemplos como casos extremos.

El primer caso mencionado presenta una gran

dispersión en los tiempos de residencia, por lo que dado que no existe un único valor para dichos tiempos se toma un valor promedio estadístico que se denomina tiempo de retención medio, mientras que en el reactor tubular la dispersión es mínima. Este último es útil en el caso de reacciones cuya velocidad disminuye con la concentración; pero si la velocidad de reacción aumenta con la concentración, como en los procesos autocatalíticos, el concepto se invierte y en este caso es más útil el reactor con mezclado total.

Siendo la fermentación glucónica, como todos los procesos microbiológicos, un proceso autocatalítico, se hace necesario emplear un reactor con mezclado total como es el tanque agitado.

-O-O-O-O-O-

## PARTE EXPERIMENTAL

### CAPITULO II

#### ESTUDIO DEL PROCESO EN SISTEMA DISCONTINUO

##### Microorganismo y medio de mantenimiento:

Los ensayos se efectuaron con una cepa de Aspergillus niger NRRL-3, proveniente del Northern Utilization Research and Development del Departamento de Agricultura de los EE.UU., productora de ácido glucónico y empleada para la producción de gluconato de sodio (5).

La cepa fué conservada en dos tubos con tierra y para su cultivo, esporulación y germinación se emplearon los medios indicados por Blom (5), que figuran en la TABLA II.

##### Técnicas:

Se hicieron determinaciones de: glucosa, empleando el método de Shaffer-Somogyi (62); de consumo de hidróxido de sodio, que se registró automáticamente y además se determinó microorganismo. En este último caso se presentaron dificultades, por lo que se ensayaron diversas técnicas que se detallan a continuación.

1) Por filtración: a) Con papel de filtro: filtrando un volumen medido de muestra, lavando con agua destilada hasta pH neutro, secando en estufa a 90° durante ocho horas, enfriando en desecador y pesando. Este método presenta el inconveniente de que

TABLA II

Constituyentes	Medio de Cultivo	Esporulación	Germinación	Fermentación
Glucosa, g.	30,00	50,00	58,70	240,00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, g.	0,10	0,12	0,18	0,16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , g.	0,12	0,15	0,22	0,19
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H, g.		0,60	0,49	0,42
KCl, g.		0,20		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , g.	0,25			
CaCO <sub>3</sub> , g.	4,00			
Tartrato de hierro, g.		0,01		
Extracto de papa, ml.	500,00	30,00	4,40	3,71
Macerado de maíz, ml.		30,00		
Cerveza, ml			0,11	0,10
Urea, g.	0,25			
Peptona, g.	25,00			
Agar, g.	1000,00	1,50	1000,00	1000,00
Agua hasta, ml.				

durante las pesadas el papel absorbe humedad rápidamente dando resultados falsos y que además se hace difícil lavar bien el micelio.

b) Por placa filtrante: (Jena g3) también sobre un volumen medido de muestra, lavando con agua destilada hasta neutralidad, secando en estufa a 90 grados durante ocho horas, enfriando en desecador y pesando.

2) Por centrifugación: centrifugando un volumen medido de muestra a 6.000 G., lavando con agua destilada en el mismo tubo y centrifugando, repitiendo esta operación hasta pH neutro, secando estufa a 90°C ocho horas, enfriando en desecador y pesando. Con este método fue difícil separar una pequeña porción de micelio que sobrenadaba en el líquido, principalmente en las muestras extraídas en la parte final del proceso.

Las técnicas detalladas no dieron resultados reproducibles, en algunos casos por dificultades de la misma técnica, como se aclara más arriba, y en otros debido a los problemas ocasionados por la espuma producida durante los ensayos, la cual arrastra microorganismo hacia la parte superior del fermentador; por agregado de antiespumante no se resuelve el problema porque el microorganismo queda adherido a la pared, tapa del tanque, eje del agitador y electrodos de medida de pH que no están en contacto con el medio, produciéndose así diferencias de concentración en las muestras. A esto se suma el hecho de que el micelio se va adhiriendo a los cortacorrien-

tes y demás accesorios sumergidos en el líquido y da ja de estar en suspensión quedando retenido por lo tanto en el tanque en el momento de hacer la extracción para la determinación.

De las técnicas empleadas, la que dió mejores resultados fué la de filtración por placa que no presentó los inconvenientes de absorción de humedad ya mencionado, siendo también el lavado del micelio mucho más sencillo.

#### Equipo e instrumental:

El desarrollo de inóculo (etapa de germinación) se hizo en erlenmeyer de 1000 ml. de capacidad, liso, en agitador rotatorio a 240 r.p.m. y a 32°C.

El proceso se efectuó en un equipo que consta de (figura N° 1): un tanque de acero inoxidable (8) de diez litros de capacidad (1), agitador de ocho paletas (2), cuatro cortacorrientes (3) y un orificio lateral de salida de medio (4). La tapa consta de orificios de: entrada de antiespumante (5), medio fresco (6), hidróxido de sodio (7), electrodos para pH (8) y tubo para extracción de muestra (9). Los electrodos están conectados a un medidor de pH (10) y éste al controlador registrador (11) el cual comanda la válvula solenoide (12) para el agregado de hidróxido de sodio contenido en una probeta (13) y cuyo volumen se registra continuo y automáticamente por medio de un tambor (14) que da una vuelta cada veinticuatro horas por acción de un mecanismo de relojería. Trabajando en sistema continuo el medio fresco se agrega desde dos frascos de vidrio Pyrex de nueve li-

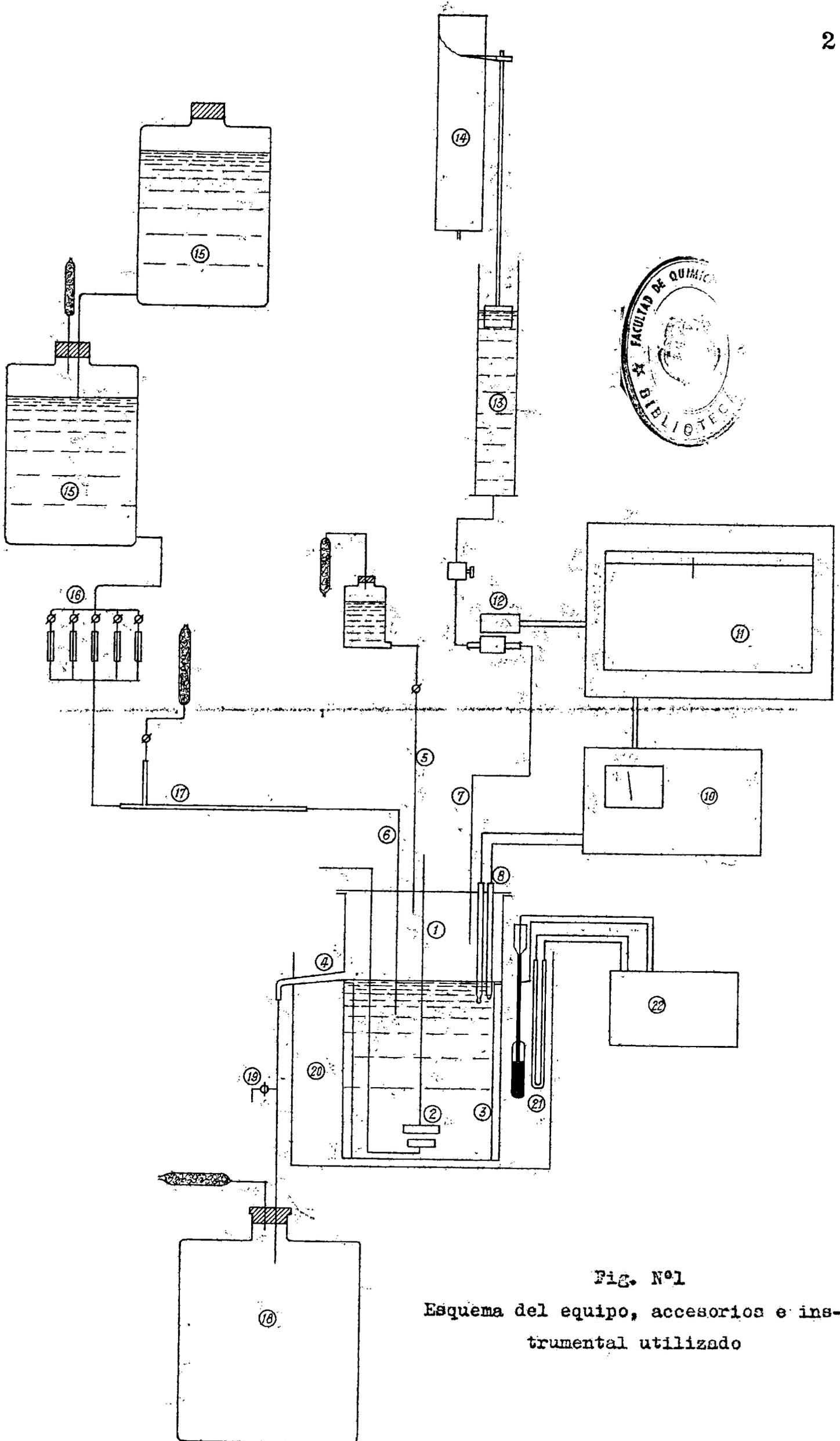


Fig. N°1  
Esquema del equipo, accesorios e instrumental utilizado

tros de capacidad cada uno (15). El caudal se controló por un juego de capilares (16) y se midió por un sistema de capilar y burbuja (17), útil para determinación de caudales muy bajos (hasta 1000 ml/h). El medio fermentado se recogió en un frasco de doce litros de capacidad (18). El conducto de descarga del tanque lleva una tubuladura lateral (19) para la extracción de muestra. El tanque de fermentación estaba colocado en un baño de agua (20) calentado eléctricamente (21) y cuya temperatura se controló por medio de un "relay" electrónico (22).

#### Condiciones operativas:

Para la preparación de inóculos se partió de esporos conservados en tierra. Los medios empleados para las distintas etapas están indicados en la tabla II.

Los esporos conservados en tierra se sembraron en tubo inclinado, incubándolos durante siete días en estufa a 30°C; de este tubo se pasaba a un erlenmeyer de 250 ml. de capacidad que contenía 30 ml. de medio de esporulación, incubándolo siete días a 30 °C, en estufa. Estos esporos se extraían con 50 ml. de agua estéril que contenía tres gotas de tween 80; de la suspensión así obtenida se tomaban 10 ml. que se sembraban en el medio de germinación. El número de esporos sembrados en este medio fué de aproximadamente  $10 \times 10^6$  esporos/ml, empleando para su determinación una cámara de Neubauer.

La germinación se efectuó en erlenmeyer de mil

ml. de capacidad con 300 ml. de medio, colocado en agitador rotatorio a 240 r.p.m. Este equipo está colocado en una cámara estufa con regulación automática de temperatura; el período de germinación fué de 24 hs., a 32°C.

Todas las experiencias se efectuaron en tanque agitado de diez litros de capacidad empleando cinco litros de medio en sistema discontinuo y seis litros en sistema continuo. En un caso se empleó un tanque de cinco litros según se indica más adelante.

Todos los medios y la mayor parte del material se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos en autoclave. La glucosa se esterilizó separadamente de las sales y el medio se mezcló en el momento de la siembra. Los electrodos para medida de pH se esterilizaron con solución de formol al 20% durante 15 minutos y se lavaron con abundante cantidad de aguas estéril.

El volumen de inóculo utilizado en cada experiencia fué del 6% con respecto al volumen total empleado. El caudal de aire fué en todos los ensayos 0,5 litros de aire por litro de medio y por minuto; la agitación, 700 r.p.m.; la temperatura, 32°C; el agente neutralizante, hidróxido de sodio al 20%; y el antiespumante, aceite de oliva o emulsión de silicona R.D. 1:15, según los casos.

#### Variables consideradas:

1) Composición de los medios: En las primeras experiencias en sistema discontinuo se estudió la

modificación del medio de fermentación originalmente propuesto por Bloom (Tabla II), puesto que dicho medio creó numerosos problemas debido a la excesiva formación de espuma. Para tal fin se prepararon tres medios distintos (Nº 1, 2 y 3). En el medio Nº 1 se empleó extracto de malta al 0,5%, en el medio Nº 2 se utilizó macerado de maíz, mientras que en el medio Nº 3 se preparó sin extracto de malta ni macerado de maíz. El contenido de glucosa fué de aproximadamente 20% y la concentración de sales la misma para todos los medios. Todos estos ensayos se realizaron a pH 5,0.

En el gráfico nº 1 y en la tabla III se observan los resultados obtenidos con el medio Nº 1. La curva (A) se refiere a un ensayo en el cual a las doce horas de iniciado el proceso fué necesario agregar ácido sulfúrico al 20% para bajar el pH; este problema fué atribuido a la presencia de espuma que perturbaba en forma indirecta la señal de los electrodos, puesto que cuando el pH llegaba a 5,0 se abría la válvula de descarga de hidróxido de sodio, el cual caía sobre la espuma tardando mayor tiempo en llegar al medio y por lo tanto a los electrodos. Cuando el pH subía por encima de 5,0 se cerraba la válvula dosificadora, pero durante el tiempo transcurrido entre la apertura y cierre de la válvula ingresaba excesiva cantidad de álcali, el cual al incorporarse al medio provocaba un aumento anormal de pH. La curva (B) corresponde a una experiencia realizada sin los

TABLA III

Medio N°1  
 pH 5,0  
 Antiespumante, aceite de oliva

Tiempo (h)	Glucosa consumida (g/l)		% de NaOH consumido	
	(A)	(B)	(A)	(B)
4,0		1,7		—
10,0		8,2		3,0
14,0	8,1		4,0	
16,0	11,8		5,5	
20,0	16,3		8,5	
23,2		41,1		18,5
25,2		60,8		25,5
28,5		93,9		41,5
30,9		95,7		49,0
33,0		102,8		57,0
34,0	71,8		27,0	
36,0		141,8		67,0
38,0	75,9		35,5	
40,0	86,5		37,0	
46,0	112,8		59,5	
47,0		193,6		96,0
57,0	160,2		84,5	

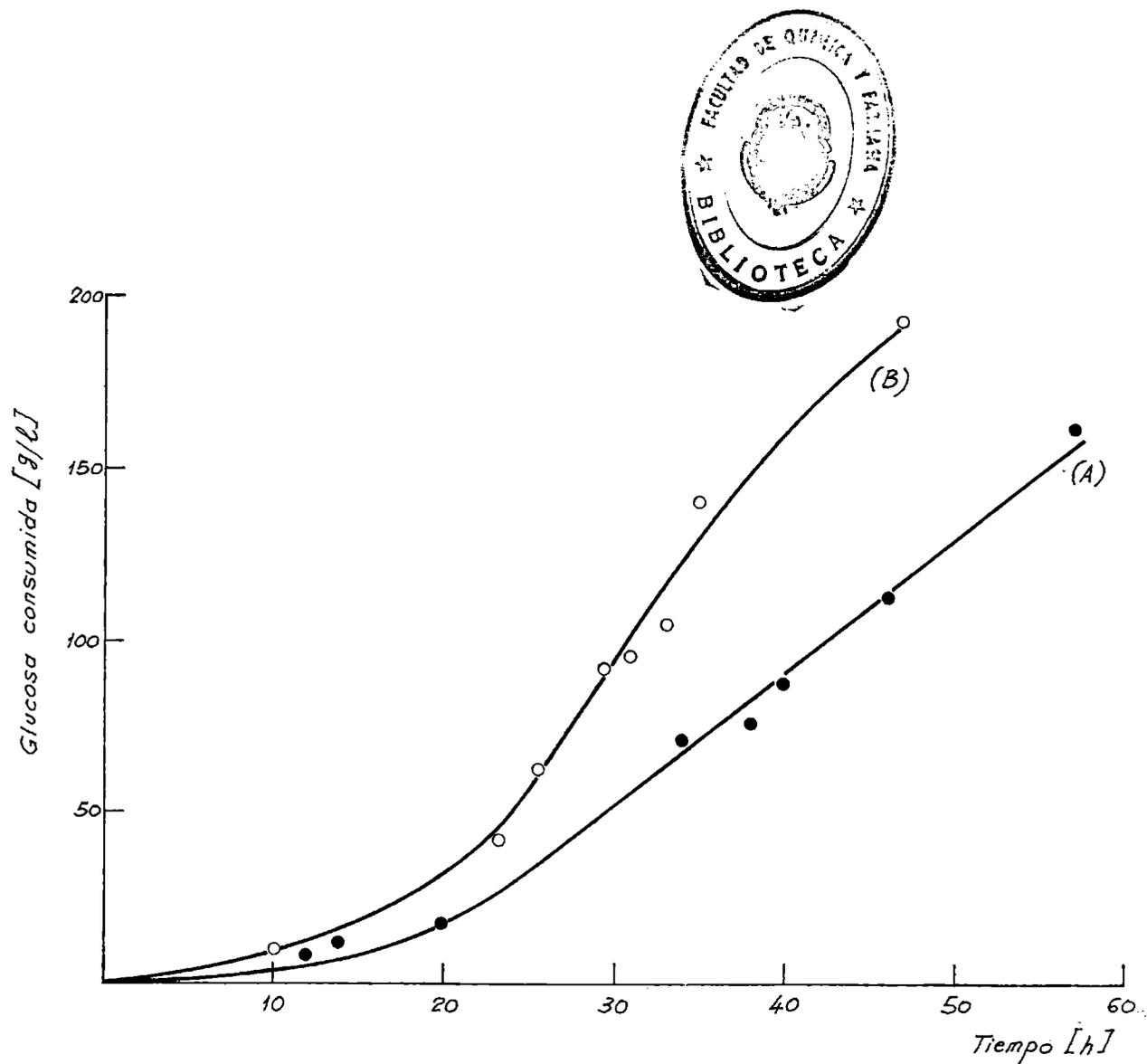


GRAFICO N° 1

ENSAYOS CORRESPONDIENTES AL MEDIO N° 1; pH 5,0

Curva (A)  $x_s^s = 183 \text{ g/l}$

Curva (B)  $x_s^s = 197 \text{ g/l}$

inconvenientes observados anteriormente. En este caso el consumo de glucosa se acelera con respecto al anterior.

En el gráfico N° 2 y en la TABLA IV se muestran los resultados obtenidos empleando el medio N° 2. La curva (C) representa los valores de glucosa correspondientes a una experiencia en la cual durante la fase inicial, aproximadamente de 10 horas, la temperatura observada fué de 27°C por mala regulación del baño termostático. Después de este lapso la temperatura se reguló a 32°, no presentando problemas de espuma. Por otra parte la curva (D) se refiere a un ensayo realizado en las mismas condiciones que el anterior, salvo que en este caso se reguló la temperatura a 32°C sin inconvenientes. Al trabajar en estas condiciones se agudiza el problema de espuma, - que fué imposible controlar con aceite de oliva; por tal motivo se recurrió a la emulsión de silicona ya mencionada.

Las conclusiones que surgen de estos ensayos son las siguientes: el macerado de maiz disminuye el tiempo total del proceso con respecto al observado cuando se utilizó extracto de malta. El uso de silicona como antiespumante da mejores resultados que el aceite de oliva, pero con el medio que contiene macerado de maiz y trabajando en las condiciones óptimas, aún cuando se utiliza silicona, se produce espuma regularmente y esto presenta el mismo inconveniente que el ya mencionado en el ensayo (A). Por n

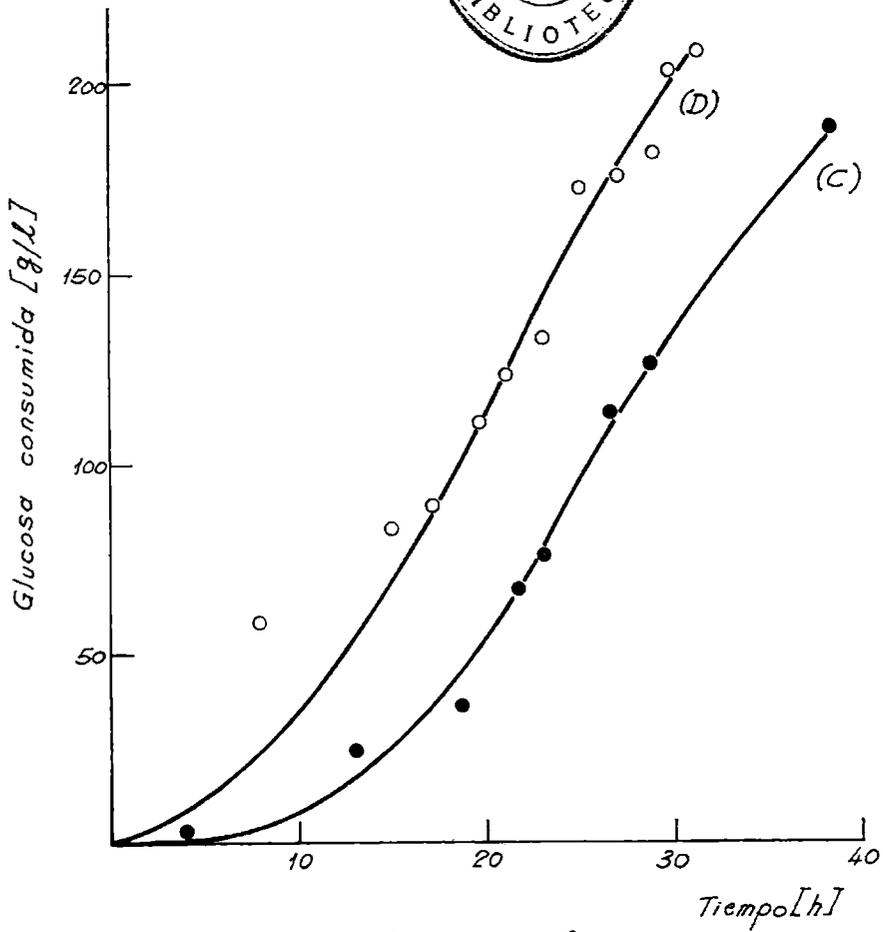
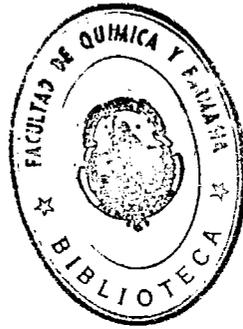
TABLA IV

Medio N°2

pH 5,0

Antiespumante, aceite de oliva y silicona R.D. (ver texto)

Tiempo (h)	Glucosa consumida (g/l)		% de NaOH consumido	
	(O)	(D)	(O)	(D)
4,0	2,8		2,0	
8,0		59,9		1,8
14,5	22,8		10,0	
14,7		82,5		18,4
16,7		87,5		29,1
18,5	38,0		21,5	
19,7		110,9		42,4
20,7		122,8		47,5
21,5	65,7		30,0	
22,7		132,9		57,2
23,5	77,2		43,5	
24,7		172,0		66,3
26,5	113,1		56,0	
26,7		172,6		75,8
28,5	125,8		63,4	
28,7		181,2		84,9
29,7		202,7		89,4
30,7		206,2		95,0
38,5	189,0		95,0	



GRA'FICO N° 2

ENSAYOS CORRESPONDIENTES AL MEDIO N° 2; pH: 5,0

Curva (C)  $X_0^s$  190 g/l

Curva (D)  $X_0^s$  209 g/l

tra parte un pH demasiado elevado, como consecuencia de la espuma, es perjudicial para el microorganismo, dado que es posible que este valor excesivo de pH tenga alguna acción sobre la rigidez de la pared celular por lo cual ésta perdería capacidad para resistir la presión osmótica interna (55).

Los ensayos efectuados con el medio Nº 3 fueron muy lentos, no consignándose los resultados por haber sido suspendidos al verificarse una disminución apreciable de la velocidad del proceso.

La conclusión que surge a través de los ensayos realizados con los distintos medios conduce a la elección del medio Nº 1, por ser el que presentó menor formación de espuma y por ser además satisfactorio desde el punto de vista de la productividad.

2) Seleccionado el medio Nº 1, se programaron ensayos a pH 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5, teniendo en cuenta que el pH óptimo para la velocidad máxima de oxidación de la glucosa es 5,8 (29).

Los valores de pH ensayados inicialmente fueron: 5,0; 5,5 y 6,0 y los resultados obtenidos se observan en la TABLA V y en el gráfico nº 3. Las variaciones de pH fueron de  $\pm 0,2$  del valor indicado. En el primer caso, a pH 5,0, se observa que la conversión de la glucosa se inició aproximadamente a las diez horas y el tiempo total del proceso osciló alrededor de las 55 horas. A pH 5,5 la conversión comienza ligeramente antes que el caso anterior, siendo el tiempo total del ensayo de aproximadamente 45

TABLA V

Medio N°1  
Antiespumante, aceite de oliva

Tiempo (h)	Glucosa consumida (g/l)			% de NaOH consumido		
	pH			pH		
	5,0	5,5	6,0	5,0	5,5	6,0
4,0		0,8			—	
10,0			1,0			0,9
13,5		9,8			5,9	
14,0	6,2			4,4		
15,5		31,9			—	
16,0			8,2			2,9
18,0	26,8			10,4		
19,5		56,1			19,5	
22,0	47,3			17,6		
23,0			28,7			11,2
23,5		80,9			33,3	
25,0			44,0			17,7
26,0	57,3			25,4		
27,5		105,4			43,0	
35,0			134,2			64,8
35,5		152,7			71,6	
38,0	101,7		167,0	50,0		78,0
39,5		170,1			77,8	
42,0	122,4		198,8	59,0		94,7
45,5		198,8			—	
46,0	141,5			67,0		
50,0	162,8			76,8		

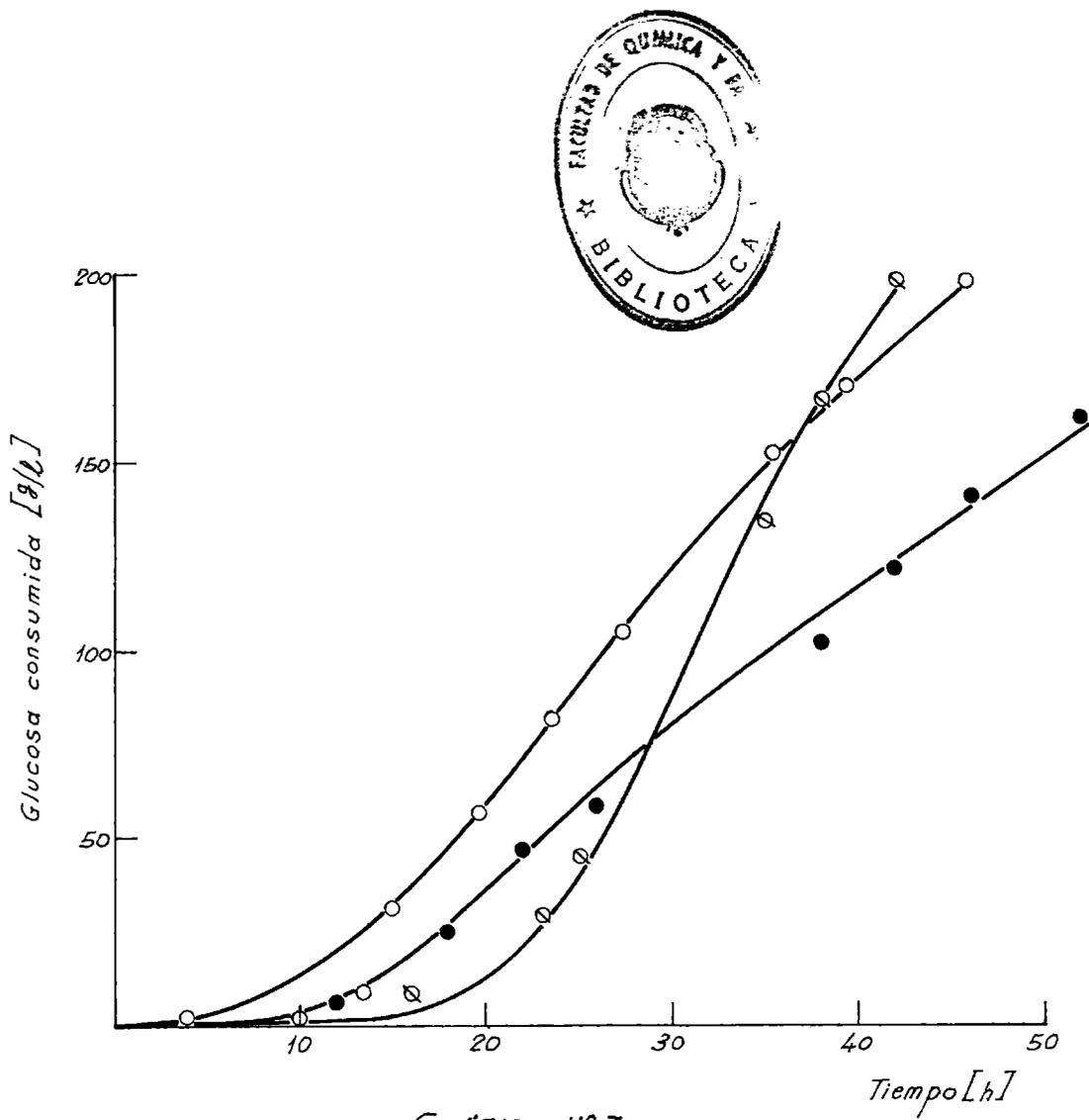


GRÁFICO N°3

INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA VELOCIDAD DE CONSUMO DE GLUCOSA.

- pH 5,0  $X_0^s = 185 \text{ g/l}$
- pH 5,5  $X_0^s = 205 \text{ g/l}$
- ⊗ pH 6,0  $X_0^s = 205 \text{ g/l}$

horas. Finalmente a pH 6,0 el período inicial del proceso se alarga llegando a ser de 13 a 14 horas, pero durante la fase logarítmica la velocidad de consumo de glucosa aumenta.

De lo dicho anteriormente se hace evidente - que a medida que aumenta el pH desde 5,0 a 6,0 aumenta la velocidad de consumo de glucosa y se acorta el tiempo total de fermentación. Sin embargo, en el último caso mencionado la fase inicial es más largo que en los ensayos efectuados a pH menor.

Este fenómeno se atribuyó a que el inóculo se encontraba al final del período de germinación a pH muy bajo (entre 2,5 y 3,0) y que al hacer la siembra, el microorganismo ingresaba a un medio con pH muy superior al del medio del cual provenía, retardándose el tiempo de adaptación a las nuevas condiciones de desarrollo.

Las máximas velocidades de consumo de glucosa para los valores de pH ensayados están indicados en la TABLA VI; dichos valores fueron calculados gráficamente.

TABLA VI

Medio N°1

Antiespumante, aceite de oliva

pH	$\frac{dx^H}{dt}$ (g/l.h)
5,0 5,5 6,0	5,0 7,5 11,0

Los inconvenientes mencionados llevaron a ensayar dos tipos de soluciones:

a) Obtener una germinación a pH 6,0 controlada automáticamente y efectuar el ensayo al mismo pH.

b) Efectuar la etapa de germinación sin controlar pH, desarrollando la etapa inicial del proceso a pH más bajo que 6,0.

Para el caso a) se preparó un inóculo a pH controlado a 6,0 en un fermentador de vidrio Pyrex New Brunswick Scientific (NBS) de cinco litros de capacidad, empleando 1500 ml. de medio de germinación y 2 ml. de una solución de silicona R.D. 1:15 como anti espumante. El pH se controló automáticamente por agregado de hidróxido de sodio al 20%. Prácticamente a las 24 hs. había cesado el consumo de hidróxido, presentando desarrollo abundante. De este medio de germinación se sacaron 300 ml. en probeta estéril y se sembraron en el tanque de fermentación. De esta manera se logró un inóculo que en todo momento estuvo a pH 6,0.

Los resultados de esta fermentación se muestran en el gráfico N° 4, curva (C) y en la TABLA VII. Se observa que, a pesar de que el consumo de glucosa comienza relativamente pronto, la duración del ensayo se alarga llegando a ser de cincuenta horas, siendo la velocidad máxima de consumo de glucosa de 5,5 g/l.h.

Las experiencias realizadas según b) fueron iniciadas a pH 5,0 y 5,5 figurando los resultados en

TABLA VII

Medio N°1  
 pH 6,0  
 Antiespumante, aceite de oliva

Tiempo (h)	Glucosa consumida (g/l)			% de NaOH consumido		
	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)
12,0			7,4			—
15,5	24,1			9,0		
18,0			20,3			11,5
21,5	52,9	40,1		25,0	—	
22,0			36,0			17,0
23,0		51,0			25,4	
23,5			55,6			22,5
25,5			68,3			30,0
26,0		71,9			33,6	
26,5	84,1			38,0		
31,5	102,0			—		
35,0			91,5			48,0
37,0			103,3			57,5
38,0		130,0			69,5	
38,5	139,9			69,5		
39,5			117,5			59,6
40,0		137,4			74,0	
41,0			124,8			64,0
43,0			136,0			69,5
44,0	161,0			—		
45,0		163,7	138,4		87,5	74,5
47,0			156,2			79,0
47,5	172,6			99,0		

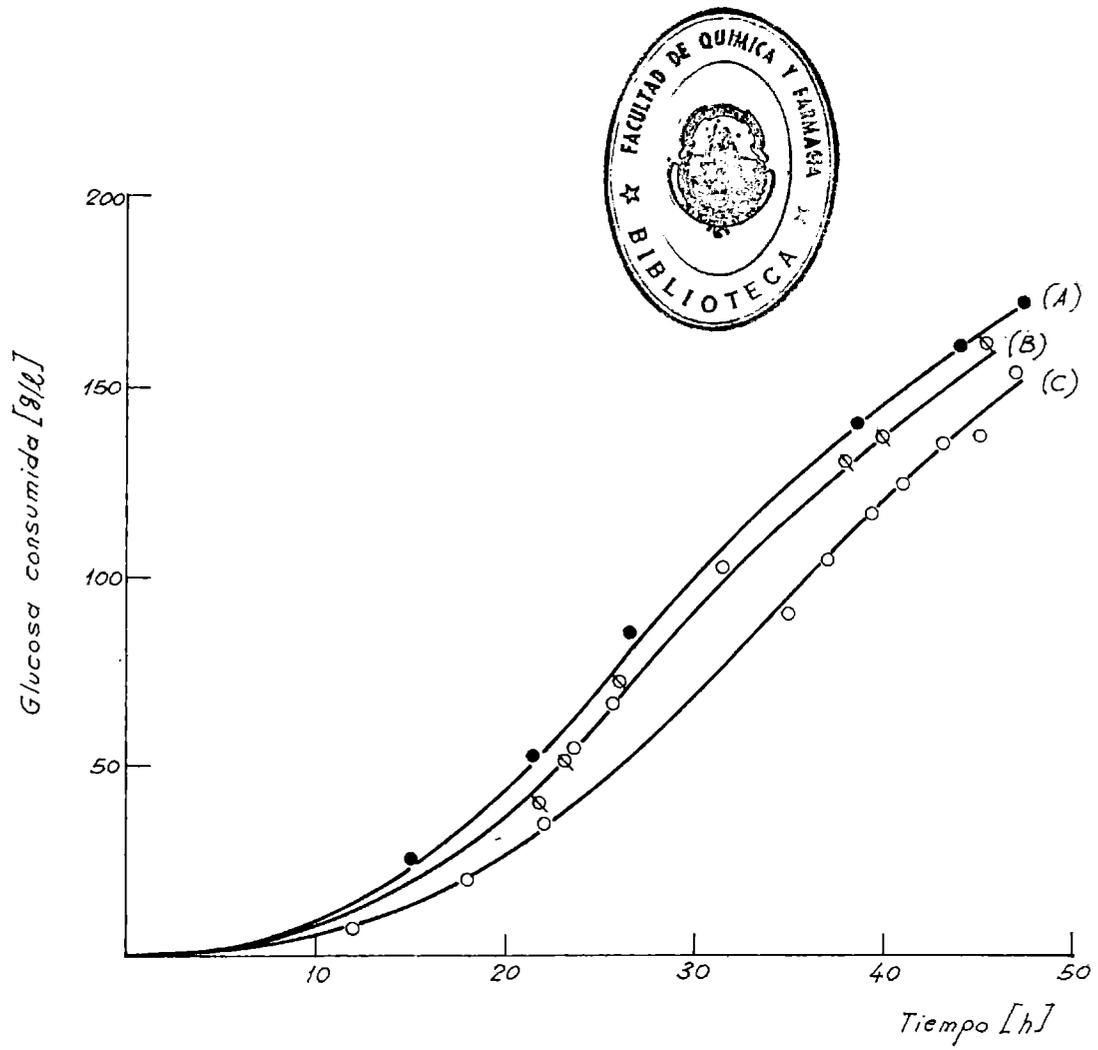


GRÁFICO Nº 4

ENSAYOS EFECTUADOS A pH 6,0 EXPLICACIÓN EN EL TEXTO

- Curva (A)  $X^s$  179 g/l
- ◻ Curva (B)  $X^s$  185 g/l
- Curva (C)  $X^s$  185 g/l

la tabla VII y en el gráfico N° 4 (curvas (A) y (B)). De acuerdo con la experiencia adquirida anteriormente el proceso se inició a pH 5,0 en un caso y a las diez horas se cambió a pH 6,0, mientras que en el otro caso se inició a pH 5,5 cambiándolo a 6,0 también a las diez horas. El tiempo total de fermentación fué para ambos casos de aproximadamente cuarenticinco horas. Durante la fase logarítmica del proceso iniciado a 5,0 la velocidad máxima de consumo de glucosa fué 6,5 g/l.h, mientras que en el segundo caso dicho valor llegó a 6,0 g/l.h. Los resultados obtenidos no mostraron pues diferencias significativas respecto a los ensayos anteriores.

Con posterioridad a los ensayos que se acaban de detallar, se efectuaron experiencias a pH 6,5 cuyos resultados demostraron que la productividad del proceso disminuyó con respecto a los ensayos anteriores. Para que los resultados pudieran ser comparativos con los otros procesos se realizaron nuevamente ensayos a pH 6,0 y 6,5. En la TABLA VIII y en el gráfico N° 5 se dan los resultados obtenidos en los nuevos ensayos, mientras que en la TABLA IX se consignan las velocidades máximas de consumo de glucosa que, como en el caso anterior, se calcularon gráficamente; se puede apreciar que de dichos valores el correspondiente a 6,5 es superior al valor que se obtiene a pH 6,0 y a su vez este valor es inferior al obtenido en ensayos similares efectuados anteriormente a este pH; también en la última TABLA

TABLA VIII

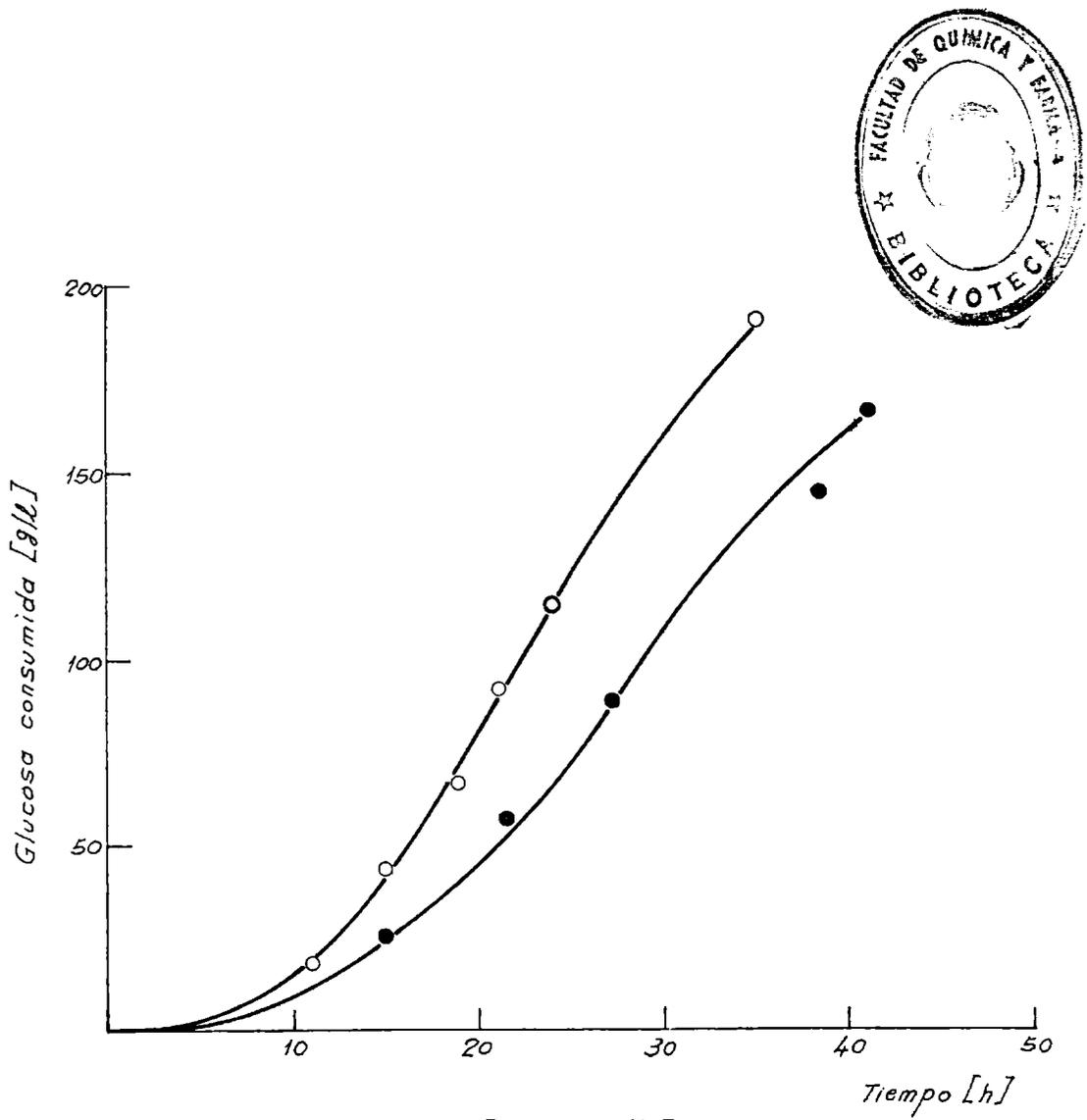
Medio N°1  
Antiespumante, aceite de oliva

Tiempo (h)	Glucosa consumida (g/l)		% de NaOH consumido	
	pH		pH	
	6,5	6,0	6,5	6,0
11,0	18,3		8,5	
15,0	43,9		21,5	
15,5		26,4		14,9
19,0	67,8		36,5	
21,0	91,9		43,2	
21,5		56,2		25,0
24,0	116,8		53,7	
26,5		89,1		36,6
35,0	191,0		—	
38,5		145,3		68,5
40,5		169,1		74,0

TABLA IX

Medio N°1  
Antiespumante, aceite de oliva

pH	$dx^2/d\theta$ (g/l.h)
5,0	5,0
5,5	7,5
6,0	11,0
-----	
6,0	7,0
6,5	9,0



se han expuesto con fines comparativos las diferentes velocidades máximas que se obtuvieron a través de los distintos ensayos, todos ellos realizados en las mismas condiciones, excepto en lo que se refiere a PH. Los tres primeros ensayos indicados en la TABLA IX fueron realizados en lapsos cortos entre sí; entre el tercer y cuarto ensayo (a pH 6,0) hubo una diferencia en tiempo de aproximadamente diez meses, lapso durante el cual se presentaron numerosos problemas con el medidor de pH que imposibilitó la continuación regular de las experiencias y la falta de reproducción de resultados en las velocidades de consumo de glucosa se atribuye a una pérdida de productividad del microorganismo, por lo que se tomaron como válidos los últimos ensayos efectuados comparativamente, puesto que para los fines del presente trabajo éstos son los que interesan, dado que los rendimientos obtenidos en los primeros ensayos no pudieron ser reproducidos.

#### Curvas de microorganismos:

En ninguno de los ensayos expuestos anteriormente se dan resultados con respecto a la concentración de microorganismo debido a los problemas ya mencionados. Las determinaciones que se hicieron durante los ensayos dejaban dudas respecto a los resultados, puesto que no se obtuvieron valores razonables, dado que la representación de los mismos daba curvas con picos descendentes durante el crecimiento. Esto indicaba que la concentración de microorganismos

TABLA I

Medio N°1  
 pH 6,0  
 Antiespumante, aceite de oliva

Tiempo (h)	Glucosa consumida (g/l)	Microorganismo (g/l)
0,0	0,0	0,38
12,0	53,0	1,51
14,0	69,7	
17,0	96,4	2,20
20,0		2,60
25,0	142,5	2,16
36,0	228,0	1,84

inóculo 6/  
 24hs  
 $10^7$  esporos/ml  
 $\approx 6,59/g$

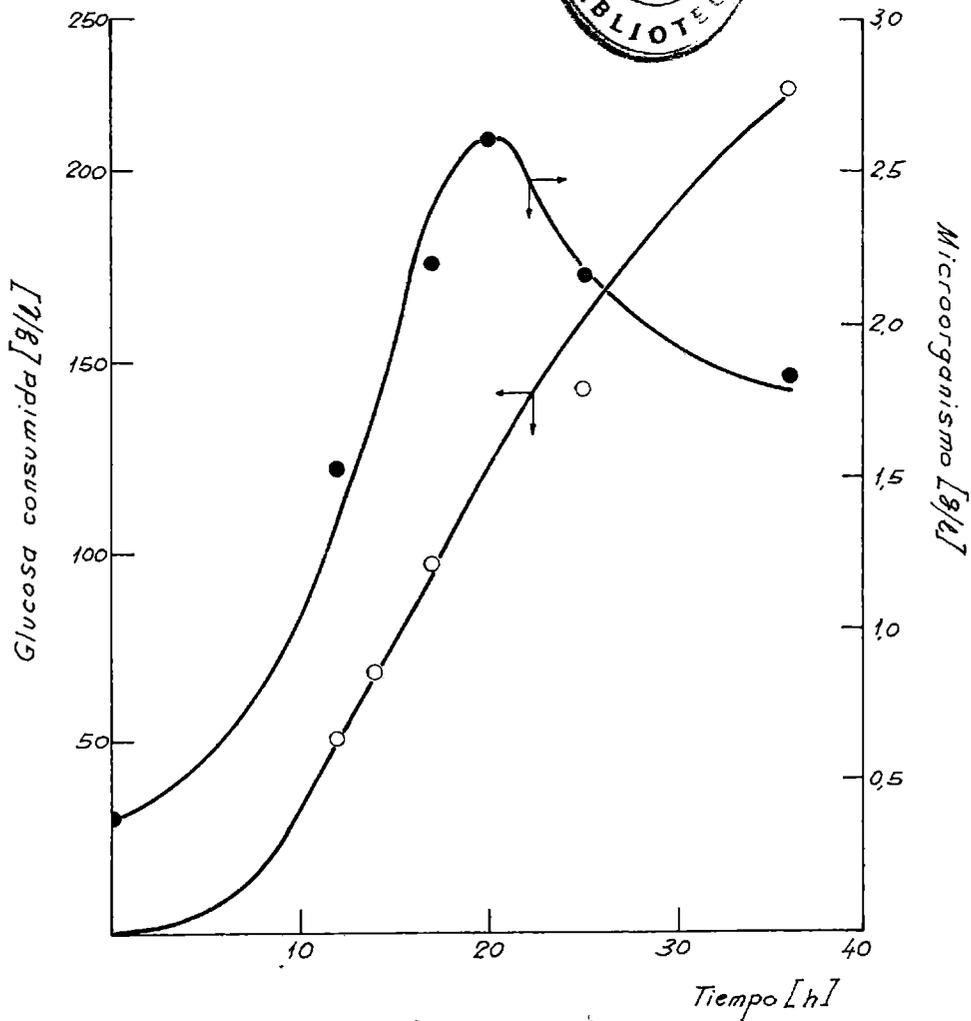
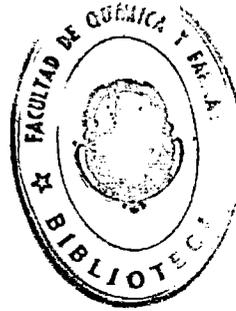


GRAFICO N°6

CURVAS DE CONCENTRACION DE MICROORGANISMO  
 Y CONSUMO DE GLUCOSA OBTENIDAS EN TANQUE  
 DE VIDRIO.

no disminuía en la etapa logarítmica para volver a tomar valores normales en determinaciones posteriores. Este fenómeno se atribuyó al depósito de microorganismo en la pared y accesorios del equipo por acción de la espuma. Para comprobar si la anomalía se debía a este problema se realizó un ensayo en tanque de vidrio Pyrex de cinco litros de capacidad (NBS). Este tipo de equipo permitió comprobar visualmente la formación de espuma, por lo que se pudo controlar su aparición, lográndose de esta manera una curva como la que se observa en el gráfico 126 (TABLA X). De acuerdo con estos resultados la visualización de la espuma permite, por lo menos en principio, resolver el problema ocasionado por la misma, pero este equipo no se continuó empleando en los ensayos posteriores debido a que no fue posible efectuarle las modificaciones necesarias para adaptarlo al sistema continuo.

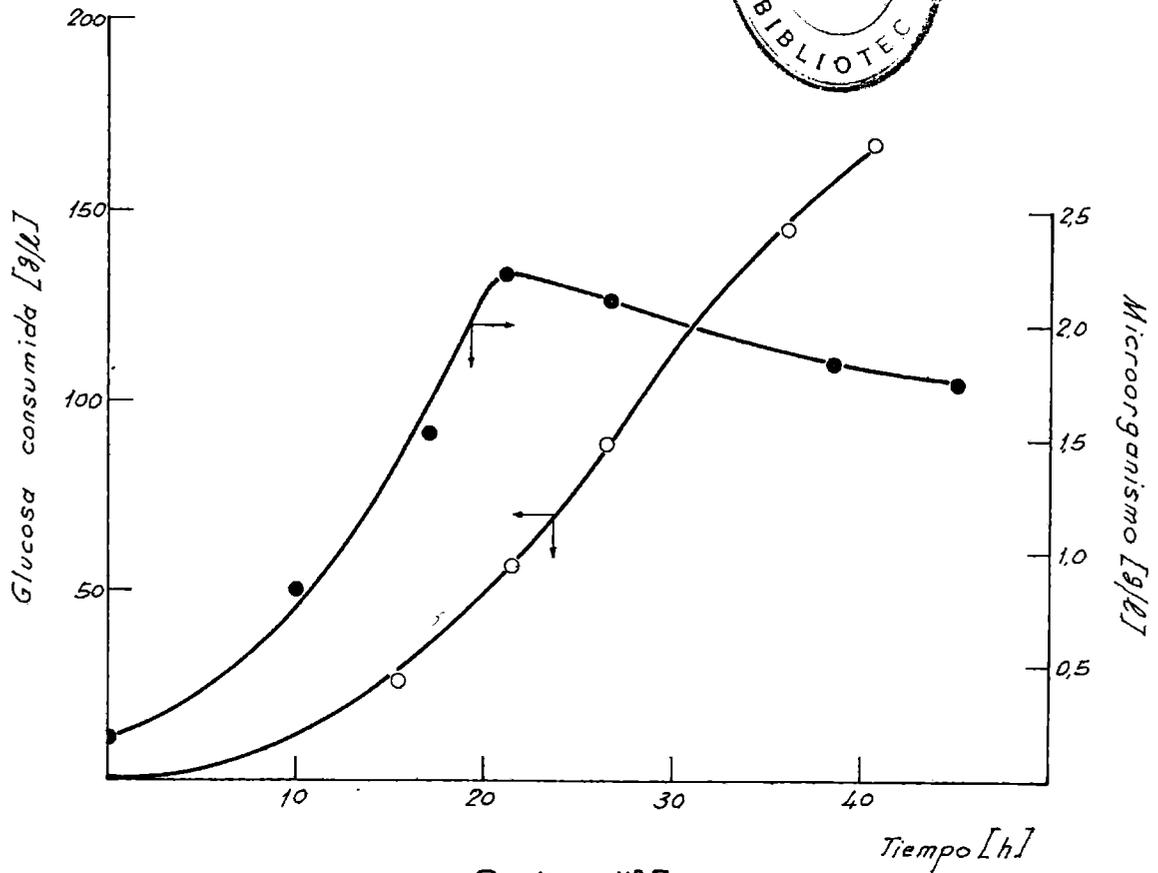
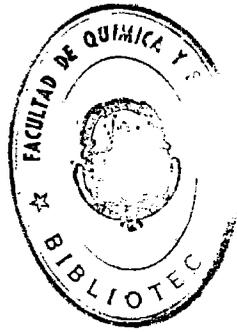
#### Constante de velocidad de crecimiento:

El cálculo analítico en sistema continuo en una etapa requiere establecer las correlaciones entre formación de ácido glucónico y microorganismo. En razón de los problemas que se plantearon referente a la determinación de microorganismo ya mencionados no fue posible calcular dichas relaciones para todos los ensayos efectuados. Por lo tanto, para efectuar dicho cálculo se resolvió utilizar los datos de las experiencias consideradas más aceptables por la forma de las curvas de crecimiento (gráficos

TABLA XI

Medio N°1.  
pH 6,0  
Antiespumante, aceite de oliva

$\theta$ (h)	$X^e$ (g/l)	$dX^e/d\theta$ (g/l.h)	$k^e$ (h <sup>-1</sup> )	$X^s$ (g/l)	$X^p$ (g/l)	$dX^p/d\theta$ (g/l.h)	$k^p$ (h <sup>-1</sup> )
0,0	0,22						
4,0	0,72						
5,0	0,73	0,01	0,013				
6,0	0,75	0,02	0,026				
7,0	0,77	0,02	0,025				
8,0	0,80	0,03	0,037	7,5	8,1		
9,0	0,83	0,03	0,036	9,5	10,2	2,1	2,5
10,0	0,87	0,04	0,047	12,0	12,9	2,7	3,1
11,0	0,93	0,06	0,063	14,5	15,6	2,7	2,9
12,0	0,98	0,06	0,061	17,0	18,3	2,7	2,9
13,0	1,06	0,08	0,074	20,0	21,6	3,3	3,1
14,0	1,15	0,09	0,078	23,5	25,3	3,7	3,2
15,0	1,25	0,10	0,080	27,0	29,1	3,8	3,0
16,0	1,38	0,13	0,094	31,0	33,4	4,3	3,1
17,0	1,51	0,13	0,086	35,0	37,8	4,4	2,9
18,0	1,67	0,16	0,095	39,5	42,6	4,8	2,8
19,0	1,98	0,31	0,150	44,5	48,0	5,4	2,7
20,0	2,10	0,12	0,056	49,0	52,9	4,9	2,3
21,0	2,23	0,13	0,058	55,0	59,4	6,5	2,9
22,0	2,21	0,02	0,009	60,0	64,8	5,4	2,4
23,0	2,20	0,01		65,5	70,7	5,9	2,6
24,0	2,17	0,02		72,0	77,7	7,0	3,2
25,0	2,15			78,0	83,2	6,5	3,0
26,0	2,13			84,0	90,7	6,5	3,0
27,0	2,12			92,5	99,0	9,2	4,3
28,0	2,08			99,0	106,9	7,0	3,3
29,0	2,05			106,0	114,4	7,5	3,6
30,0	2,02			113,0	122,0	7,6	3,7
31,0	2,00			120,0	129,6	7,6	3,8
32,0	1,98			126,0	136,0	6,4	3,2
33,0	1,95			133,5	144,1	8,1	8,4
34,0	1,93			137,0	147,9	3,8	1,9
35,0	1,92			142,5	153,9	6,0	3,1
36,0	1,90			147,5	159,3	5,4	2,8
37,0	1,88			152,5	164,5	5,4	1,8
38,0	1,87			157,0	169,5	4,8	2,5
39,0	1,85			161,0	173,8	4,3	2,3
40,0	1,83			165,0	178,7	4,9	2,6



GRAFICONº 7

CONCENTRACION DE MICROORGANISMO Y DE GLUCOSA CONVERTIDA A pH 6,0.

X<sup>s</sup> 190 g/l

TABLA XII

Medio N°1  
pH 6,5  
Antiespumante, aceite de oliva

$\phi$ (h)	$X^0$ (g/l)	$dX^0/d\phi$ (g/l.h)	$k^0$ (h <sup>-1</sup> )	$X^0$ (g/l)	$X^P$ (g/l)	$dX^P/d\phi$ (g/l.h)	$k^P$ (h <sup>-1</sup> )
0,0	0,30						
2,0	0,32						
3,0	0,34	0,02	0,058				
4,0	0,38	0,04	0,105				
5,0	0,42	0,03	0,071				
6,0	0,47	0,08	0,170	4,5	4,8		
7,0	0,55	0,10	0,182	6,5	7,0	2,2	4,0
8,0	0,65	0,10	0,154	9,0	9,7	2,7	4,0
9,0	0,75	0,14	0,187	12,0	12,9	3,2	4,2
10,0	0,89	0,20	0,225	15,0	16,2	3,3	3,7
11,0	1,09	0,23	0,221	19,5	21,0	4,8	4,4
12,0	1,42	0,21	0,152	23,5	25,3	4,3	3,0
13,0	1,53	0,18	0,118	29,0	31,3	6,0	3,9
14,0	1,71	0,06	0,035	34,0	36,7	5,4	3,1
15,0	1,77	0,05		40,0	43,2	6,5	3,6
16,0	1,72	0,15		47,0	50,7	7,5	4,3
17,0	1,57	0,08		55,0	59,4	8,7	5,5
18,0	1,49	0,06		64,0	69,1	9,7	6,5
19,0	1,43	0,05		74,5	80,4	9,3 <sub>p</sub>	9,5
20,0	1,38			83,0	89,6	9,2 <sub>z</sub>	6,6
21,0	1,33			91,5	98,8	9,2	6,9
22,0	1,29			100,0	108,0	9,2	7,1
23,0	1,26			108,0	116,6	8,6	6,9
24,0	1,23			116,5	125,8	9,2	7,4
25,0	1,21			125,0	135,0	9,2	7,4
26,0	1,19			132,5	143,1	8,1	6,8
27,0	1,17			140,0	151,2	9,1	7,7
28,0	1,16			148,0	159,8	8,6	7,4
29,0	1,15			155,5	167,9	8,1	7,0
30,0	1,14			162,5	175,5	7,6	6,6
31,0	1,12			169,0	182,5	7,0	6,2
32,0	1,11			175,0	189,0	6,5	5,8
33,0				180,5	194,9	5,9	
34,0				186,0	200,8	5,9	
35,0	1,10			191,0	206,2	5,4	

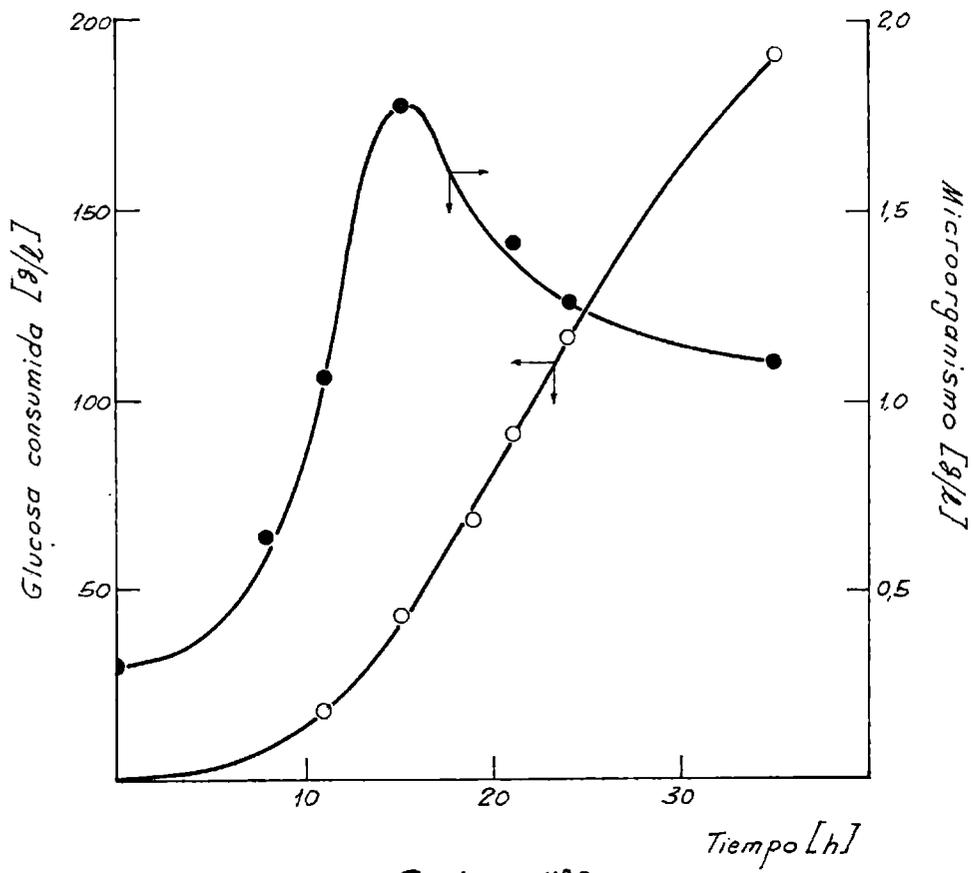


GRÁFICO N°8

CONCENTRACION DE MICROORGANISMO Y DE GLUCOSA  
CONVERTIDA A pH 6,5

$X^s$  199 g/L

Nº 7 y Nº 8 y TABLAS XI y XII). En dichas tablas los valores subrayados fueron determinados experimentalmente para microorganismo y glucosa; el resto de los valores fueron determinados por lectura sobre las curvas. Los datos correspondientes a concentración de ácido glucónico fueron calculados a partir de la glucosa consumida, mientras que la velocidad de formación de microorganismo y ácido glucónico y las constantes de velocidad de los mismos se calcularon a partir de los datos ya mencionados. Estos datos fueron tomados como base para el estudio del sistema continuo utilizando el medio Nº 1 a pH 6,5.

Los valores de las constantes de velocidad de crecimiento que se mencionan se dan solo desde un punto de vista informativo tal como suele encontrarse en la bibliografía referente a este tipo de procesos, cuando se trabaja con microorganismos filamentosos. También esto llevó a no insistir en la realización de experiencias en sistema discontinuo.

-O-O-O-O-O-

### CAPITULO III

#### EXPERIENCIAS EN SISTEMA CONTINUO

Los primeros ensayos efectuados en sistema continuo utilizando el medio completo mostraron un desarrollo excesivo de microorganismo que provocaba tapamiento en el tubo de salida del tanque. Por esta razón, también se efectuaron experiencias agregando medio completo y solución de glucosa en forma alternada con el objeto de controlar el crecimiento microbiano.

Los gráficos N<sup>o</sup> 9, 10, 11 y 12 corresponden a experiencias efectuadas en sistema continuo; en los mismos se representan los valores de concentración de microorganismo, glucosa y velocidad de consumo de hidróxido de sodio. De los ensayos enumerados, los tres primeros fueron efectuados a velocidad de dilución constante, aunque a valores diferentes entre sí. Todos los ensayos presentaron un inconveniente común, y es el que se refiere a la obturación de la salida de muestra debida a la deposición de microorganismo en la misma. En el ensayo correspondiente al gráfico N<sup>o</sup> 9 se produjo depósito y acumulación de microorganismo por lo que no se pudieron hacer mediciones de concentración de micelio a la salida del tanque; a fin de solucionar este inconveniente se optó por inyectar aire a mayor presión; esta técnica es la que se aplicó en las experiencias siguientes (gráficos N<sup>o</sup>

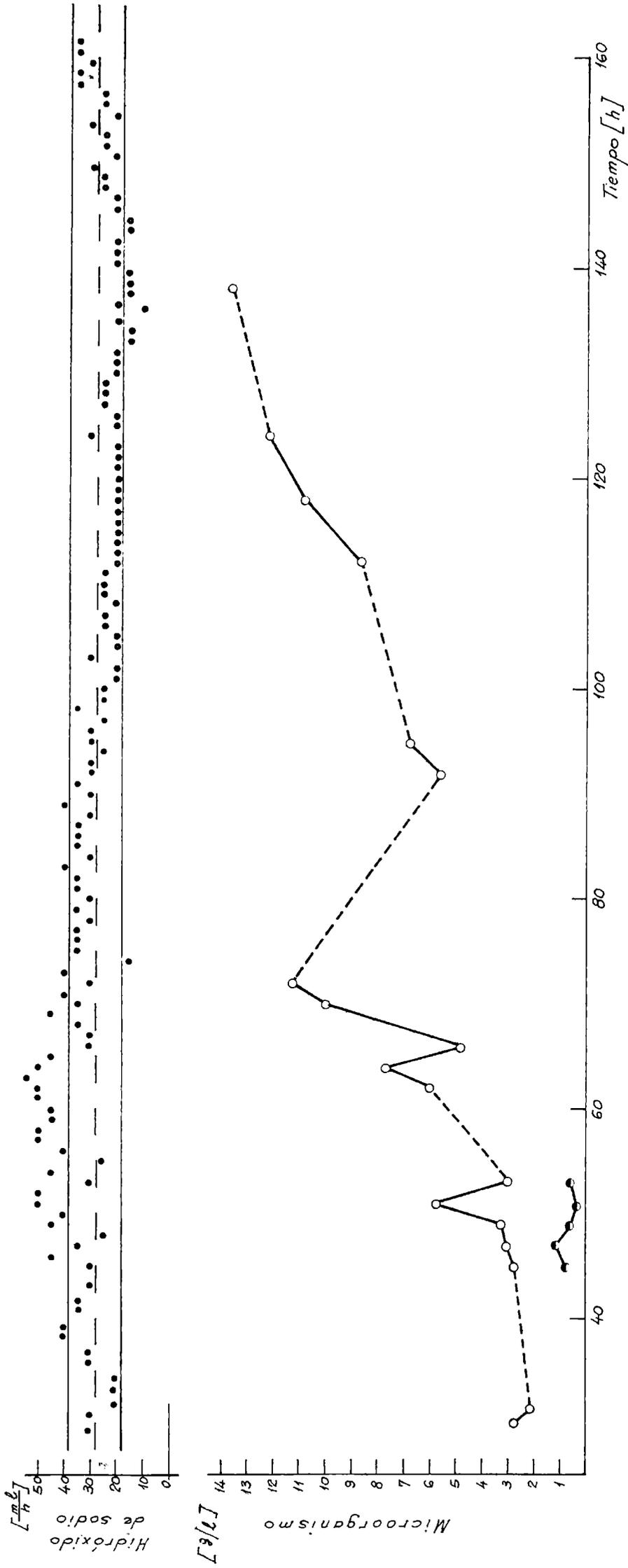


GRAFICO Nº 9

HIDRÓXIDO DE SODIO CONSUMIDO Y MICROORGANISMO PRODUCIDO.  $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$

○ Muestras tomadas del tanque.

● Muestras tomadas a la salida.

$X^s = 110 \text{ g/l}$

ORIFICIO DE SALIDA DE MUESTRA 0,5 mm.



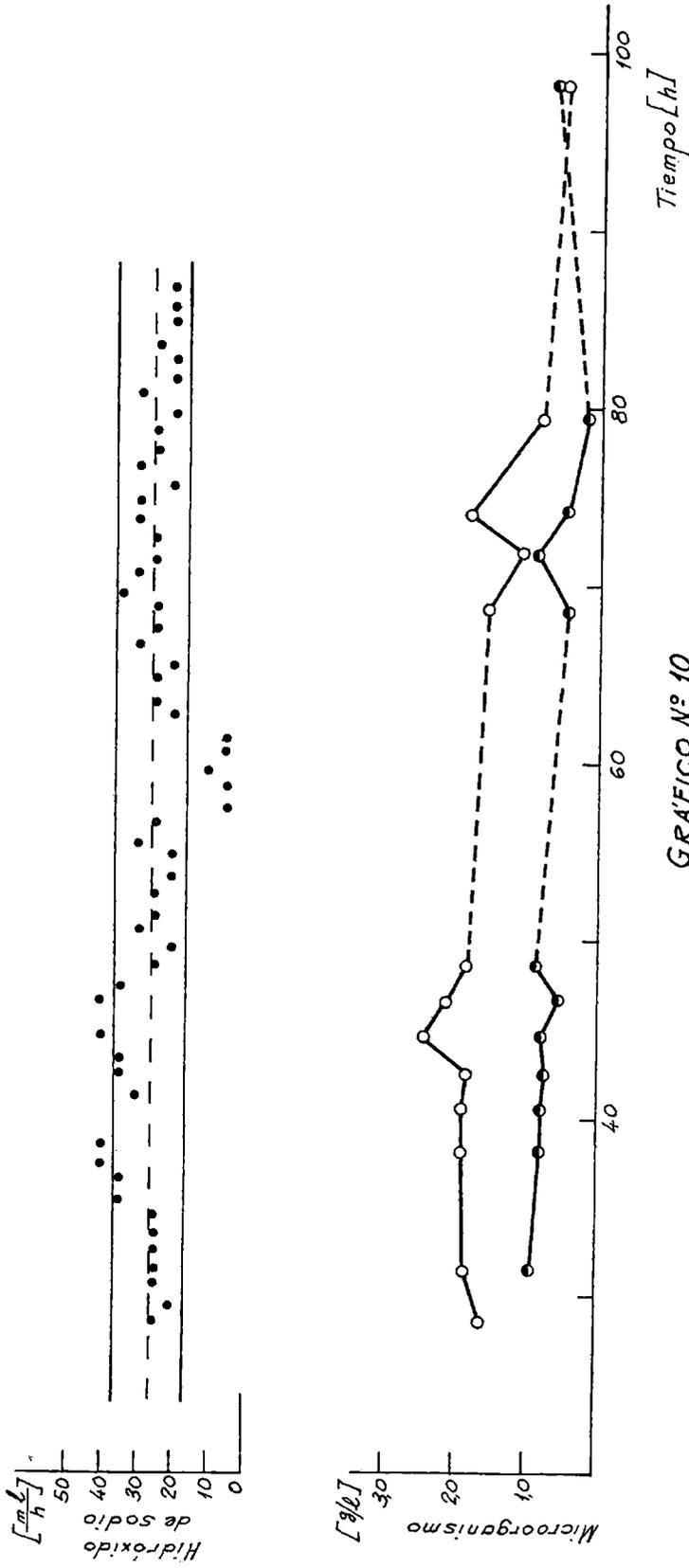


GRAFICO Nº 10

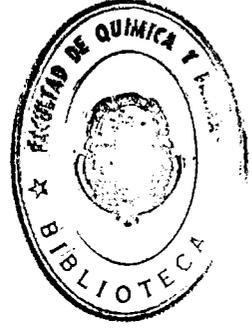
HIDRÓXIDO DE SODIO CONSUMIDO Y MICROORGANISMO PRODUCIDO.  $D = 0,085 \text{ h}^{-1}$

○ Muestras tomadas del tanque.

● Muestras tomadas a la salida.

$X^s = 110 \text{ g/l}$

ORIFICIO DE SALIDA DE MUESTRA: 0,5 m.m.



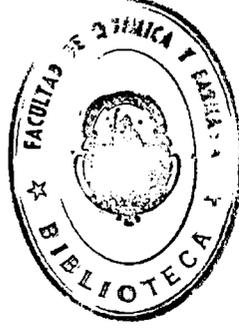
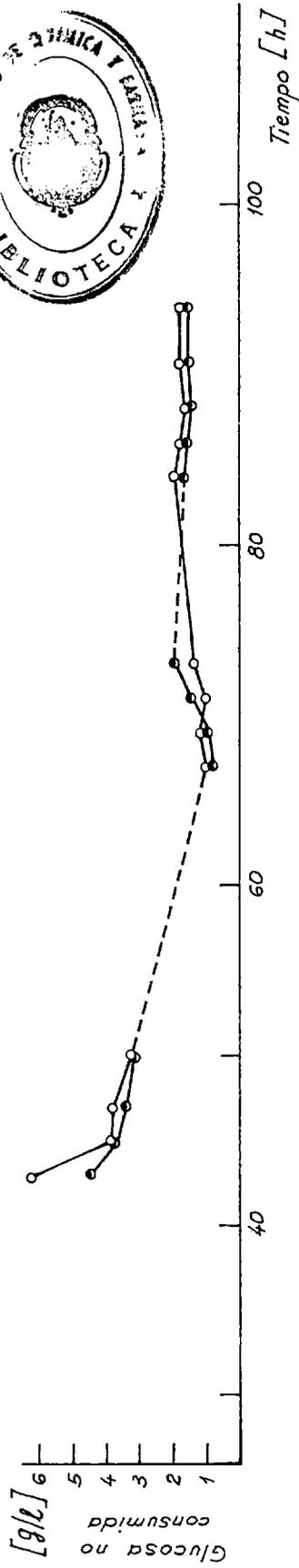
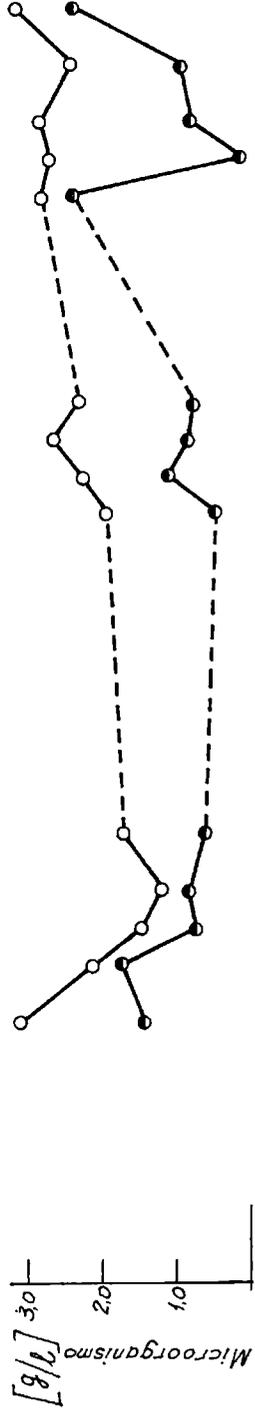
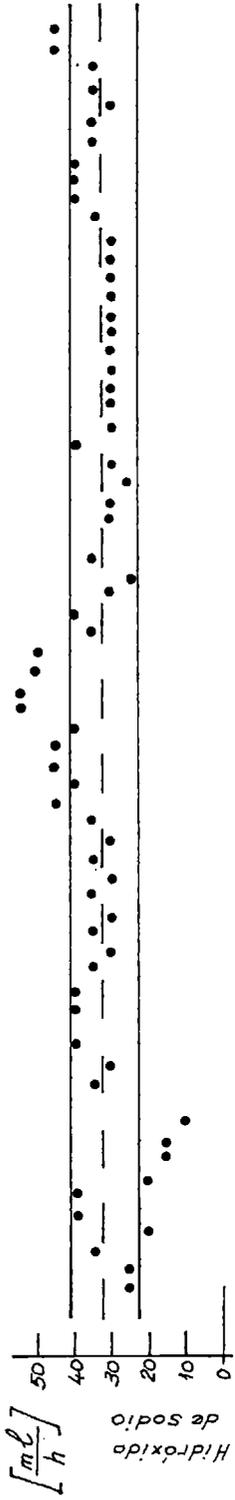


GRÁFICO Nº 11

HIDRÓXIDO DE SODIO CONSUMIDO, MICROORGANISMO PRODUCIDO Y GLUCOSA REMANENTE. D = 9,065

- Muestras tomadas del tanque.
- Muestras tomadas a la salida.
- X<sup>s</sup> 110 g/l

ORIFICIO DE SALIDA DE MUESTRA: 0,5 m.m.

10 y N° 11) en las que se puede apreciar que la curva de microorganismo presenta muy pocas oscilaciones debido a que frecuentemente se destapó la salida en la forma ya indicada; también se incluyen en el gráfico N° 11 los valores de glucosa no convertida.

Teniendo en cuenta los cálculos ya efectuados (TABLA XII) en lo que se refiere a la constante de crecimiento de microorganismo y los resultados anteriores de los ensayos en sistema continuo, se resolvió emplear velocidades de dilución aún menores que las ya ensayadas, con el objeto de incrementar la conversión de glucosa; para tal fin se decidió comenzar con velocidades de dilución de  $0,047 \text{ h}^{-1}$ . En el gráfico N° 12 (TABLA XII) se puede ver que los valores de concentración de glucosa prácticamente coinciden tanto en el tanque como a la salida del mismo, lo cual indica que para esta sustancia existen buenas condiciones de mezclado lo que no sucede para microorganismo, ya que nuevamente se manifiesta el problema evidenciado anteriormente, razón por la cual los datos son muy variables. A pesar de ello se promediaron los mismos para aplicarlos posteriormente. Para hidróxido de sodio, dada la dispersión de puntos, se tomaron los valores medios (línea de trazos) y las desviaciones standard de dichos valores (línea llena (1)).

#### Influencia de la velocidad de dilución:

El gráfico N° 13 (TABLA XIV) presenta valores promedios obtenidos de la TABLA XIII para microorga-

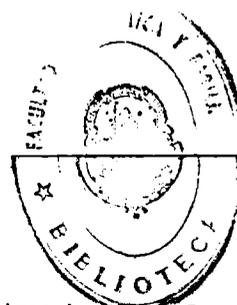


TABLA XIII

T = muestras tomadas en el tanque; S = muestras tomadas a la salida

e (h)	I <sup>a</sup> no consumida (g/l)		I <sup>b</sup> consumida (g/l)		I <sup>c</sup> (g/l)		D (h <sup>-1</sup> )
	T	S	T	S	T	S	
64,0	5,9	4,7	104,1	105,3	3,38	1,04	0,0475
67,5	7,0	6,1	103,0	103,9	3,54	1,98	
70,0	7,3	6,3	102,7	103,9	5,04	3,98	
74,5	4,7	4,4	105,3	105,6	4,02	2,28	
89,0	5,4	5,1	104,6	104,9	3,92	3,12	
92,0	5,6	5,0	104,4	105,0	3,52	2,32	
95,0	4,9	4,6	105,1	104,3	3,54	3,08	
100,0	7,3	7,3	102,7	102,7	3,92	(1,82)	
115,5	10,5	9,2	99,5	100,8	3,26	1,10	0,0583
119,0	11,3	11,3	98,7	98,7	2,38	(0,78)	
123,0	12,1	11,9	97,9	98,1	2,70	0,68	
136,0	5,8	—	104,2	—	3,32	(0,33)	
139,0	9,8	9,8	100,2	100,2	4,90	0,28	
144,0	6,4	6,9	103,6	103,1	3,78	0,66	
147,0	4,9	5,8	105,1	104,2	3,52	1,80	
161,0	8,2	8,2	101,8	101,8	5,06	1,22	0,0462
164,0	6,2	6,3	103,8	103,7	4,06	(1,35)	
167,0	5,8	—	104,2	—	3,74	(1,45)	
171,0	5,8	5,1	104,2	104,9	3,32	(1,55)	
184,0	5,0	4,3	105,0	105,7	1,38	(1,95)	
187,0	4,7	4,7	105,3	105,3	3,34	(2,05)	
190,0	5,3	5,1	104,7	104,9	3,59	2,18	
193,0	5,1	3,1	104,9	106,9	4,90	(2,05)	
199,0	5,3	—	104,7	—	2,10	(1,85)	
230,5	5,1	—	104,9	—	1,64	(0,65)	
236,0	5,5	1,7	104,5	108,3	1,78	(0,39)	
240,0	—	5,0	—	105,0	(2,30)	0,12	
242,0	5,3	—	104,7	—	2,58	(0,15)	
257,0	3,9	—	106,1	—	2,44	(0,06)	
260,0	3,5	—	106,5	—	2,18	(0,08)	
263,0	3,1	3,5	106,9	106,5	1,68	0,04	
265,0	3,5	3,9	106,5	106,1	2,38	0,06	
282,5	—	2,6	—	107,4	1,24	0,12	
285,0	3,5	2,6	106,5	107,4	1,10	0,06	
288,0	4,1	3,0	105,9	107,0	0,78	(0,15)	
291,0	6,8	5,8	103,2	104,2	0,32	0,24	0,0608
305,0	18,5	18,5	91,5	91,5	1,84	0,38	
307,0	19,0	16,5	91,0	93,5	3,42	0,20	
310,0	17,5	15,5	92,5	94,5	3,12	—	
312,0	—	18,0	—	92,0	2,39	—	

Los valores entre paréntesis han sido tomados de la curva.

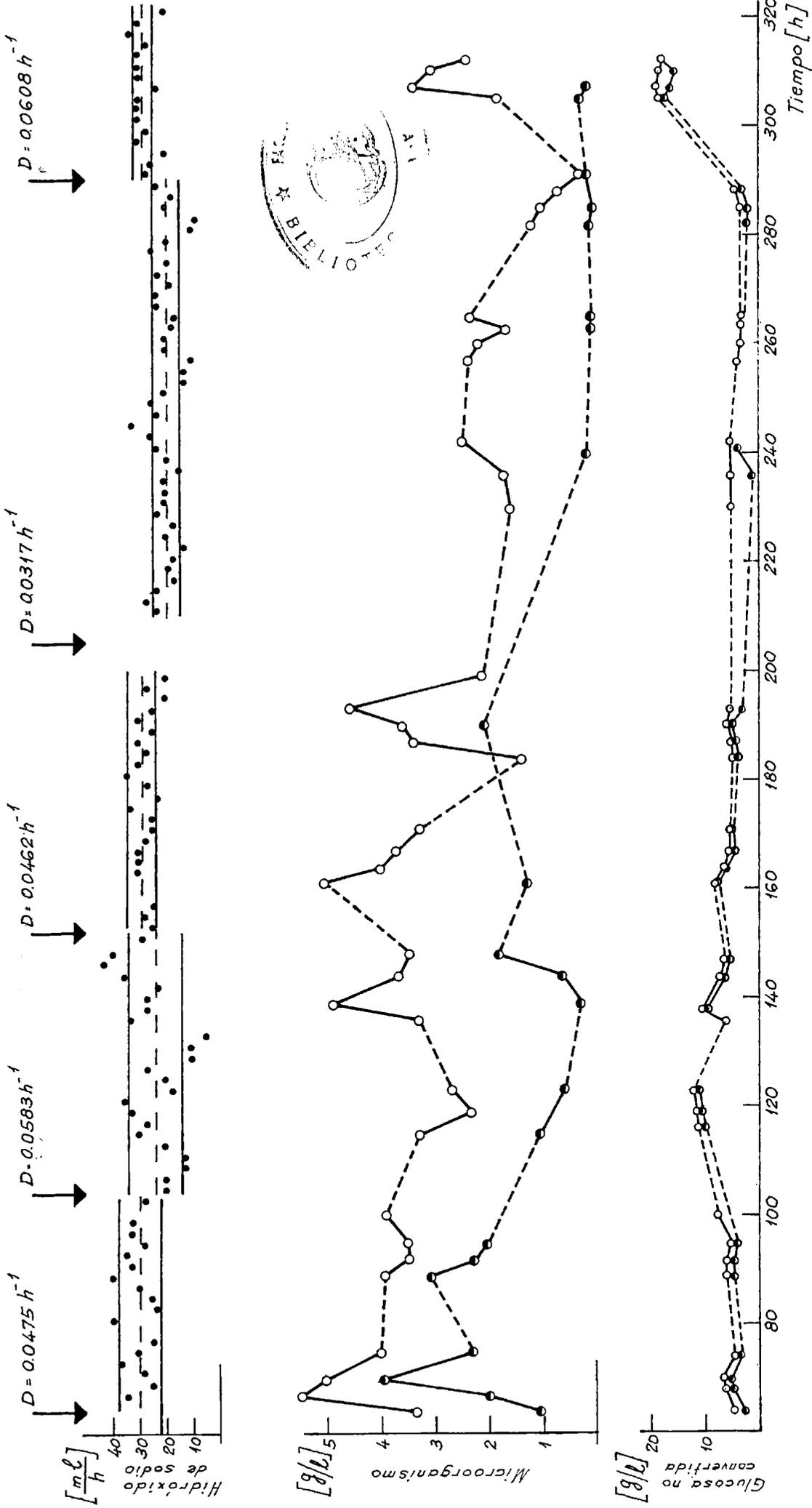


GRAFICO N° 12

VELOCIDAD DE CONSUMO DE HIDRÓXIDO DE SODIO, CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMO Y GLUCOSA NO CONSUMIDA A DISTINTOS VALORES DE  $D$

- Muestras tomadas del tanque.
- Muestras tomadas a la salida.
- $X^S = 110 g/l$

ORIFICIO DE SALIDA DE MUESTRA : 10 m.m.

nismo ( $\bar{X}^a$ ) y glucosa no convertida ( $\bar{X}^b$ ) en función de la velocidad de dilución. La curva correspondiente a glucosa no convertida es normal, es decir, los valores van aumentando a medida que aumenta la velocidad de dilución. En cambio para la concentración de microorganismo en el tanque (T) y a la salida (S) no se obtiene esa concordancia; como se ve, a baja velocidad la concentración de microorganismo disminuye, mientras que a mayor velocidad de dilución la concentración aumenta hasta un máximo para luego caer nuevamente. En los casos en que se ha trabajado con bacterias el fenómeno de disminución de concentración de microorganismo a baja velocidad de dilución no aparece (30) y en los casos en que éste ocurre esa disminución es muy leve (31), explicándose para este caso que dicho fenómeno se debía a una acción competitiva entre los metabolismos endógeno y anabólico, siendo el primero más notorio a baja velocidad de dilución.

De acuerdo con lo que se deduce de la TABLA - XII el valor máximo de velocidad de dilución sería aproximadamente de  $0,20 \text{ h}^{-1}$ ; sin embargo las condiciones de trabajo en ambos sistemas fueron diferentes, ya que en sistema continuo se trabajó con medio más diluido que en sistema discontinuo, dado los inconvenientes ya enumerados.

La velocidad de dilución tiene también influencia sobre la forma de crecimiento del microorganismo, puesto que éste forma conglomerados (pellets) a

TABLA XIV.

D (h <sup>-1</sup> )	X <sup>s</sup> (g/l)	X <sup>p</sup> (g/l)	I <sup>o</sup> (g/l)	
			T	S
0,0317	4,12	106,1	1,82	0,15
0,0462	5,52	104,4	3,46	1,73
0,0475	5,73	104,2	3,86	2,45
0,0583	8,89	101,1	3,40	0,80
0,0608	15,11	94,2	2,21	0,27

X<sub>0</sub><sup>s</sup> = 110 g/l.

X<sup>s</sup> = valor promedio de la glucosa no consumida.

X<sup>p</sup> = " " " " " consumida.

I<sup>o</sup> = " " " " concentración de microorganismo.

T = valores tomados del tanque.

S = " " " a la salida.

TABLA XV.

D (h <sup>-1</sup> )	Y <sup>o</sup> = $\frac{D\bar{X}^o}{D\bar{X}^s}$ (%)	Y <sup>p</sup> = $\frac{D\bar{X}^p}{D\bar{X}^s}$ (%)	Y <sub>E</sub> <sup>p</sup> = $\frac{D\bar{X}^p}{D\bar{X}^o}$ (%)
0,0317	1,69	98,2	94,5
0,0462	3,30	96,8	91,8
0,0475	3,70	96,4	91,2
0,0583	3,37	96,7	88,8
0,0608	2,06	86,9	84,3

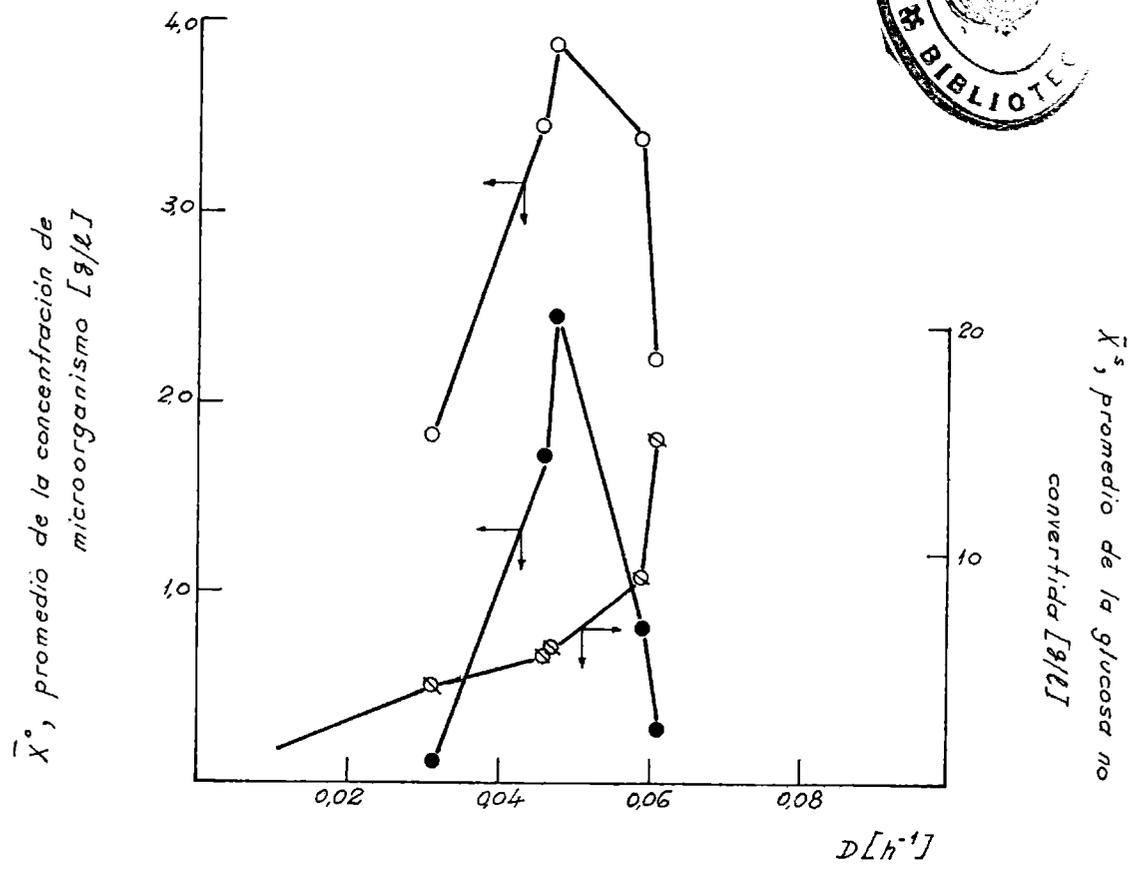
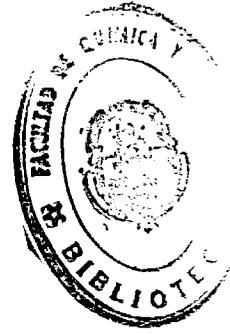


GRÁFICO Nº 13

MICROORGANISMO Y GLUCOSA NO CONVERTIDA EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN.

- Valores tomados del tanque
- Valores tomados a la salida

la más baja velocidad empleada, mientras que a valores mayores la forma de desarrollo es filamentosa.

#### Cálculo de rendimiento:

El cálculo de la constante de rendimiento se puede obtener de la ecuación (6) tanto para microorganismo como para glucosa transformada. El rendimiento efectivo (ecuación 17) es siempre menor que la constante de rendimiento cuando el valor de la velocidad de dilución es mayor que cero, debido a la glucosa que sale del equipo sin reaccionar. Estos valores están representados en el gráfico N° 14 y en la TABLA XV. Se puede apreciar que la constante de rendimiento para microorganismo ( $Y^0$ ) tiene una máxima a una velocidad de dilución igual a  $0,047 \text{ h}^{-1}$ ; esto se atribuye a los motivos obtenidos en base a los de la TABLA XIV; en cambio los valores para rendimiento efectivo (30) de glucosa transformada ( $Y_B^D$ ) van disminuyendo paulatinamente a medida que aumenta la velocidad de dilución.

#### Interpretación de resultados:

De acuerdo con los datos obtenidos en la tabla XIII, a fin de poder interpretar los resultados y efectuar los cálculos, fué necesario promediar los mismos para cada velocidad de dilución. Además para la interpretación de resultados se debe tener en cuenta que toda la deducción teórica para este tipo de sistema se basa en que el mezclado en el reactor es total. La interpretación con respecto a microorganismo, como se ha indicado antes, siempre es dudosa dada la forma en que desarrolla y su deposición y acumula---

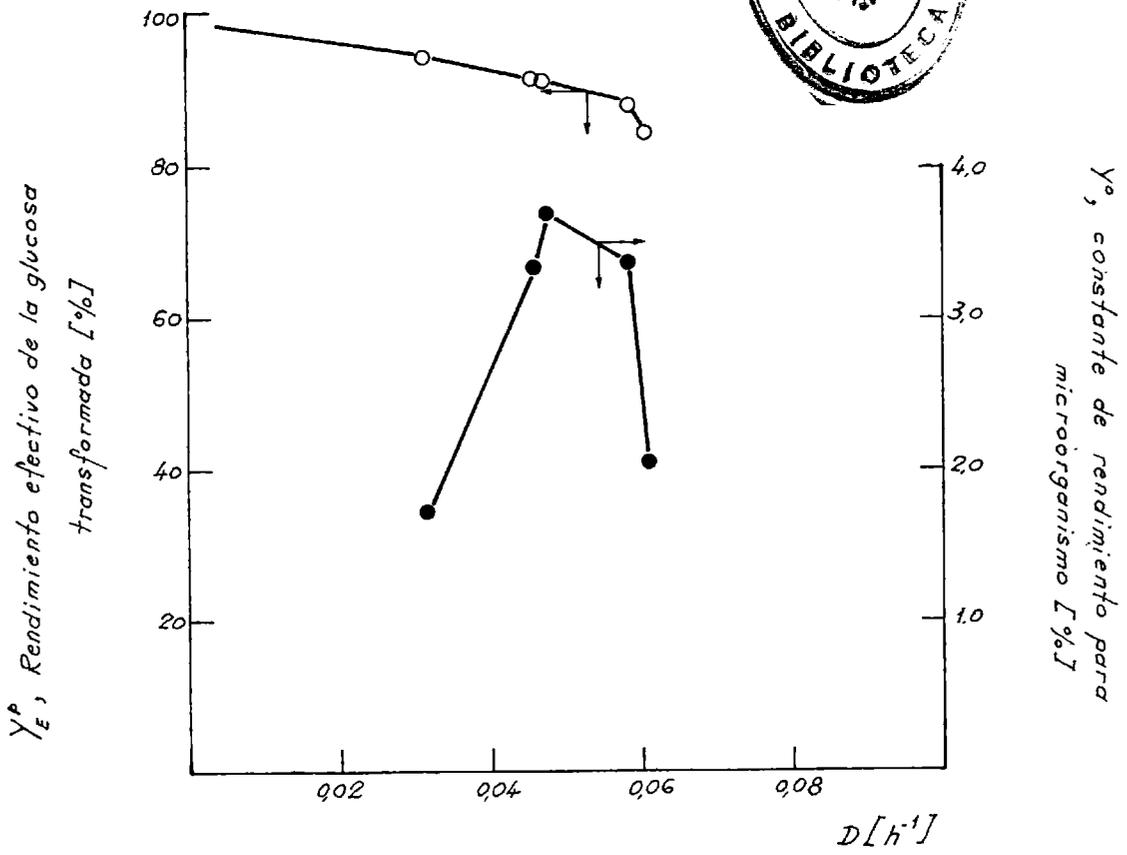
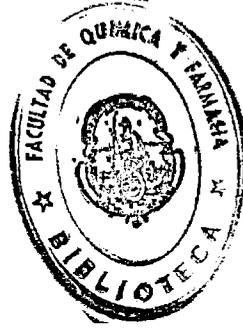


GRÁFICO N° 14

VALORES DE  $Y^0$  E  $Y_E^p$  EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN.

ción dentro del equipo; surge la duda si el microorganismo acubulado continúa desarrollando en el lugar en donde está depositado o si lo hace desprendiéndose e incorporándose al medio; este último caso es probablemente el menos posible dada la firmeza con que está depositado, hecho que se comprueba al hacer la limpieza del equipo. Las concentraciones de microorganismo aumentan con la velocidad de dilución, pero de todas maneras los valores encontrados en el tanque y a la salida son muy dispares no permitiendo ningún tipo de comparación a diferencia de la glucosa que tanto para los valores de tanque como los de salida presentan muy buena concordancia.

En los valores de rendimiento los resultados presentan la misma característica.

-O-O-O-O-O-

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES FINALES

1) Se ensayaron diversos medios, tomando por base uno propuesto por Blom y col. (TABLA II) sobre el que se hicieron modificaciones, con el objeto de lograr un sustrato que no diera mucha espuma dado los problemas que crea la misma tales como: control deficiente de pH, arrastre y depósito de microorganismo en la pared y accesorios del tanque y pérdidas de medio por el orificio de salida del aire. De los medios ensayados se adoptó uno compuesto por extracto de malta, glucosa y sales, con el cual el problema de la formación de espuma se reduce apreciablemente. Debido a la falta de conocimientos básicos sobre este aspecto no puede darse ninguna razón por la cual esto sucede.

2) Se ensayaron como antiespumante emulsión de sílica y aceite de oliva, siendo el primero más eficaz con el medio que contenía macerado de maíz, mientras que el aceite de oliva fue suficiente para el medio con extracto de malta. A pesar de que el espumante siliconado fue el más eficaz, no se lo empleó debido a su elevado costo.

De las experiencias efectuadas a distintos valores de pH, la correspondiente al valor 6,5 presentó la mayor velocidad de transformación de glucosa; la razón de esto último puede surgir de las siguientes

tas consideraciones: el mecanismo tiene lugar como se mencionó anteriormente con formación de una lactona intermedia (2). La etapa de transformación de gluconolactona es una etapa de hidrólisis no enzimática y cuya velocidad es mayor a pH más alto (34); sucede que cuando el proceso se lleva a cabo a pH bajo (5,0 - 5,5) hay acumulación de dicho intermedio; en cambio a pH más alto la hidrólisis sucede a velocidad mayor con lo que se evita la acumulación de la lactona.

4) Tanto en sistema continuo como en sistema discontinuo se presentaron los mismos problemas con respecto a la deposición y determinación de microorganismo; en el primer caso se trató de solucionar este problema trabajando con menor concentración de nutriente, alternando medio completo y solución de glucosa. Surge, como conclusión importante, en lo que a microorganismo se refiere, que el diseño de fermentador clásico o las condiciones de operación no son las más adecuadas sobre todo para un proceso en sistema continuo empleando hongos filamentosos.

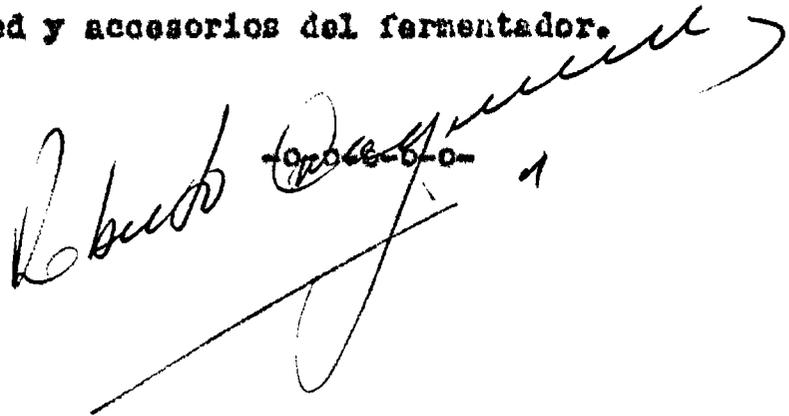
Este problema también se presentó a otras investigaciones y según una comunicación personal reciente (7) se ha propuesto como sistema más efectivo para trabajar con microorganismos filamentosos en un tanque de vidrio, sin cortacorrientes y totalmente lleno, que si bien puede utilizarse con éxito en el laboratorio, no constituye la solución ra-

querida desde el punto de vista industrial.

5) Trabajando con valores bajos de velocidad de dilución el microorganismo tiende a desarrollarse en forma de conglomerados (Pellets), mientras que por aumento de la velocidad de dilución la forma de crecimiento es de tipo filamentosos. Respecto a este fenómeno no existen datos bibliográficos que puedan servir desde el punto de vista comparativo. Pirt y Callow (55) observaron que en ensayos en sistema continuo, trabajando con Penicillium chrysogenum, la forma de desarrollo puede modificarse por la calidad y cantidad de nutriente y por el pH, mientras que en sistema continuo dicho fenómeno se observa variando pH, pero no mencionan la influencia de la velocidad de dilución. Una causa posible del cambio de la forma de crecimiento en el presente caso puede deberse a la disminución de flujo (y por lo tanto de medio), que trae como consecuencia la aparición del fenómeno observado. Según estos autores ciertos nutrientes poseen en su composición sustancias que favorecen el desarrollo de una u otra forma. Podría pensarse, en el caso de la fermentación glucónica, que la disminución de flujo trae como consecuencia la disminución de la concentración de algún metabolito fundamental para el desarrollo filamentosos por lo que el microorganismo adopta la forma de conglomerado.

6) De los resultados obtenidos en los ensayos en sistema continuo surge que es necesario trabajar

a baja velocidad de dilución para lograr conversiones de glucosa superiores al 90%, aunque es necesario tener en cuenta que la productividad total del proceso disminuye, lo cual es importante desde el punto de vista industrial. Sin embargo, trabajar con un sistema como el indicado, presupone la solución previa de la deposición de microorganismo sobre la pared y accesorios del fermentador.

Roberto ~~2006-5-0~~ 

NOMENCLATURA

Se ha empleado la nomenclatura adoptada por la American Standard Association y el American Institute of Chemical Engineers (25):

D : Velocidad o relación de dilución ( $h^{-1}$ ).

F : Caudal volumétrico de alimentación del medio (l/h).

V : Volumen de medio contenido en el reactor (l).

X : Concentración (g/l).

Y : Constante de rendimiento.

k : Velocidad específica ( $h^{-1}$ ).

## Superíndices:

: Microorganismo

s : sustrato

p : consumo

## Subíndices:

: inicial

r : retención

m : máximo

E : efectivo.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BANGROFT H.: Introducción a la Bioestadística,  
E.U.D.E.B.A., 58, Ed. 1960.
- 2.- BEATLEY R. y NEUBERGER A.  
Biochem. J. 45,540 (1949).
- 3.- BERNHARD H.  
Science 113,751 (1951).
- 4.- BILLBLO J.P.  
Textile Worl, 101, Oct.151 (1951).
- 5.- BLOM R.H., PFEIFER V.F., MOYER A.J., TRAUFLER D.  
H. y CONWAY H.F.  
Ind. Eng. Chem. 44, 435, (1959).
- 6.- BURKE J.C. y JURIST A.E.  
U.S.Patent. 2,476,082 (1959).
- 7.- CALLOW D.S.  
Comunicación personal.
- 8.- CHAIN E.B., FALADINO S., UGOLINI F, CALLOW D.S.  
y Van der SLUIS J.  
Rendiconti. Istituto Superiore di Sanità.  
English Ed. Vol. XVII, 61 (1954).
- 9.- CHESTER A.E.  
U.S.Patent. 1955,766 (1935).
- 10.- CHESTER A.E. y REISINGER F.F.  
U.S.Patent. 2.485.563 (1950).
- 11.- CHESTER A.E. y REISINGER F.F.  
U.S.Patent. 2.428.356 (1948).
- 12.- CHESTER A.E. y REISINGER F.F.  
U.S.Patent 2.485.564 (1950).

- 13.- CHENOWETH A.B., CIVIN H., COHN M. y GOLD H.  
J.Lab.Clin. Med. 26,1474 (1941).
- 14.- COYNER J.W.  
U.S.Patent 2.181.171 (1940).
- 15.- DANCKWERTZ G.C.  
Ind. Chem. March 102 (1954).
- 16.- DESNOYER S.  
U.S.Patent 2.265.271 (1942).
- 17.- DI MATTEI P. y BUTTURINI L.  
C.A. 26, 4876 (1932).
- 18.- DVORKOVITZ V. y HAWLEY T.G.  
U.S.Patent 2.584.071 (1952).
- 19.- DVORKOVITZ V. y SWIHART J.R.  
U.S.Patent 2.650.875 (1953).
- 20.- FISCHER R.  
U.S.Patent 2.211.630 (1940).
- 21.- FOSTER J.W.  
Chemical Activities of Fungi, New York,  
446 (1952).
- 22.- FOSTER J.W.  
Chemical Activities of Fungi, New York,  
454 (1952).
- 23.- FRANKE W. y LORENZ F.  
Ann. 532, 1 (1937).
- 24.- GELFAND M.  
U.S.Patent, 2.400.863 (1946).
- 25.- GERHART P. y BARTLET M.C.  
Adv. App. Microbiol. Vol. I, 215 (1959).
- 26.- GLASSTONR S.  
Tratado de Fisicoquímica. Ed. 1960. Bar-  
celona.

- 27.- GOLD H. y CIVIN H.  
J.Lab.Clin.Med. 24,1139 (1939).
- 28.- GREEN M.W.  
J.Im.Pharm.Assoc. Pharm. Ed. 7,56 (1946).
- 29.- HUMPHREY A.R. y KELLY P.J.  
Comunicación personal.
- 30.- HERBERT D., ELSWORTH R. y TELLINS R.C.  
J. Gen. Microbiol., 14,601, (1956).
- 31.- HERBERT D.  
Recent Progress in Microbiology, Simposia  
Held at the VII International Congress for  
Microbiology, Stockholm, 331 (1958).
- 32.- IBRAGIMOV I.I.  
C.A. 14986<sup>h</sup>.(1954).
- 33.- ISBELL H.S.  
U.S.Patent 1.985.255 (1935).
- 34.- JERMYN N.A.  
Biochem. Biophys. Acta 37,78 (1960).
- 35.- J. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION  
JOC, No 8, 577 (1933).
- 36.- KEILIN D. y HARTREE D.F.  
Biochem.J., 42,221 (1948).
- 37.- KEILIN D.  
Nature, 157, 801 (1956).
- 38.- KUSSHAUL W.  
U.S.Patent. 1.846.880 (1932).
- 39.- LANGE N.A.  
Handbook of Chemistry 592, 5<sup>th</sup> Ed. (1944).
- 40.- MAJOR R.T. y COOK B.W.  
U/S.Patent. 2.232.712 (1941).

- 41.- McDONALD L.  
U.S.Patent.2.362.284 (1944).
- 42.- MONOD J.  
Ann. Inst. Pasteur. 79, 390, (1959).
- 43.- NEWMAN B.O. y OBERDORFER B.  
U.S.Patent 2.511.782 (1950).
- 44.- PARKER M.E.  
Food Ind. 12,39 (1940)
- 45.- PARKER F.P.  
C.A. 36,1661<sup>7</sup> (1942).
- 46.- PARKER M.E. y BONEWITZ P.W.  
U.S.Patent 2.362.284 (1944).
- 47.- PARKER M.E. y BONEWITZ P.W.  
U.S.Patent 2.650.875 (1953).
- 48.- PASTERNAK R.  
U.S.Patent 1.861.159 (1932).
- 49.- PASTERNAK R. y AMMERMAN C.P.  
U.S.Patent 1.901.565 (1933).
- 50.- PASTERNAK R. y CRAGWALL G.O.  
U.S.Patent 1.941.485 (1934).
- 51.- PASTERNAK R. y GILES R.W.  
U.S.Patent 1.900.517 (1933)
- 52.- PASTERNAK R y GILES R.W.  
U.S. Patent 1.942.660 (1934).
- 53.- PFIZER ARGENTINA S.A.C. E I.  
Boletín Técnico B, ácido glucónico y derivados.
- 54.- PFIZER ARGENTINA S.A.C. e I.  
Boletín Técnico C., Los gluconatos Pfizer en el lavado alcalino de botellas.

- 55.- PIRT S.J. y CALLOW D.S.  
Nature, 184,307 (1959).
- 56.- PRESCOTT S.D. y DUNN C.G.  
Industrial Microbiology, New York, 578  
3<sup>th</sup> Ed. (1959).
- 57.- PRESCOTT F.J., SHOW J.K., BILLELO J.P. y GRAY-  
WALL G.O.  
Ind. Eng. Chem. Vol.45, 2, 338 (1953).
- 58.- SCHMIDT H.  
U.S.Patent 2.066.742 (1937).
- 59.- SCHMIDT H. y JUNG U.  
U.S.Patent 1.893.872 (1933).
- 60.- SCHMIDT H. y JUNG U.  
U.S.Patent 2.215.429 (1941).
- 61.- SCHOLLER W., SCHWENK E., GOBEL H., SIEGRIED M.  
U.S.Patent 1.907.592 (1933).
- 62.- SHAFER P. y SOMOGYI M.  
J.Biol.Chem. Vol.100, 395, (1933).
- 63.- SISK J. y TOENHART O.  
C.A., 33, 3000<sup>7</sup> (1938).
- 64.- SMITH J.M.  
Chemical Engineering Kinetics, Tokyo, Cap.  
4., International Student Edition (1956).
- 65.- STOECKER S.M.  
U.S.Patent, 2.175.095,(1940).
- 66.- STUART E.H.  
U.S.Patent 2.221.630 (1941).
- 67.- TABERN D.C.  
U.S.Patent 2.084.628 (1937).

68.- TEETER E.J.

J.Am. Med. Assoc. 127,973 (1945).

69.- TITAN COMPANY INC.

French Patent 840,907 (1940).

70.- TSAO G.T. y KEMPE L.L.

J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng. Vol.II  
Nº 2, 129 (1960).

71.- WEBSTER L.J.

U.S.Patent 2,214,216 (1941).

72.- WOOD W.H.

U.S.Patent. 2,199,895 (1939).

-O-O-O-O-O-

FE DE ERRATAS

Página	Renglón	Dice	Debe decir
4	20	..Tabla I..	..TABLA I..
6	1	..renales (13)(27).	..renales (13).
6	13	..de ión metálico e ión..	..de ión metálico y ión..
11	20	..metro y 4 m de..	..metro y 4,0 m de..
20	21	(16)	(15)
21	1	(17)	(16)
25	12	.., secado estufa..	..secado en estufa..
28	16	..en la tabla II.	..en la TABLA II.
30	2	..por Blom (tabla II)	..por Blom (TABLA II)
30	13	..y en la tabla III..	..y en la TABLA III..
40	10	Brunswick Scientif (NBS)..	Brunswick Scientific (NBS).
43	1	..la tabla VII..	..la TABLA VII..
46	5	..refiere a PH.	..refiere a pH.
65	7	..(ecuación 17).	..(ecuación 16).
65	21	..en la tabla XIII,	..en la TABLA XIII,