

# UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



“Biofiltración de metanol por *Pichia methanolica*”.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

**Adriana Santana Olguín**

México D.F.

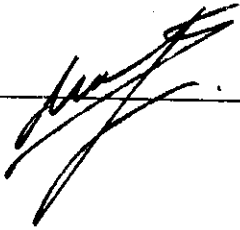
Julio, 2004

Iztapalapa, D.F. a 7 de Julio de 2004

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
"Biofiltración de metanol por *Pichia methanolica*"  
que presentó:

Adriana Santana Olguín.

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev.



---

Jurado:

Asesor: Dr. Pierre Christen.

---

Vocal.

Asesor: Dr. Eduardo Bárzana García

---

Vocal.

Sinodal: Dr. Frederic Thalasso

---

Presidente.

Sinodal: Dra. Keiko Shirai Matsumoto.

---

Secretario.

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**.

Iztapalapa, D.F. a 7 de Julio de 2004

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
“Biofiltración de metanol por *Pichia methanolica*”  
que presentó:

Adriana Santana Olgún.

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev.

\_\_\_\_\_

Jurado:

Asesor: Dr. Pierre Christen.

\_\_\_\_\_

Vocal.

Asesor: Dr. Eduardo Bárzana García

\_\_\_\_\_

Vocal.

Sinodal: Dr. Frederic Thalasso

\_\_\_\_\_

Presidente.

Sinodal: Dra. Keiko Shirai Matsumoto.

\_\_\_\_\_

Secretario.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Dedico el presente trabajo a Gabriel, mi esposo, a quien agradezco su amor, apoyo, comprensión y enorme paciencia.

A mis padres, Daniel y Epifania, que a pesar de la distancia están siempre conmigo. Gracias por su cariño y apoyo.

Agradezco al Dr. Revah, Dr. Christen y Dr. Bárzana por su apoyo y orientación. De manera especial quiero agradecer al Dr. Pierre Chisten, quien siempre estuvo tan cerca de mi trabajo, por su confianza, apoyo, compromiso y, sobre todo, por el valioso tiempo que siempre me brindo.

A la Dra. Shirai y al Dr. Thalasso por sus oportunas y acertadas observaciones.

A todos los amigos y compañeros del W107 y de la ppU4 por su amistad y apoyo.

A los amigos de la maestría.

---

## Resumen.

La biofiltración es una tecnología en la cual se emplea un consorcio microbiano cultivado e inmovilizado en un soporte para oxidar biológicamente los compuestos contaminantes gaseosos generando agua y CO<sub>2</sub> principalmente.

Este trabajo se enfocó a la biofiltración del metanol. A diferencia de un proceso de biofiltración convencional en donde se utilizan cultivos mixtos, se empleó un cultivo puro de la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Esta podría ser modificada genéticamente para que a la par de consumir metanol produzca alguna proteína heteróloga de interés. Es por lo tanto fundamental, promover la generación de biomasa y limitar la presencia de microorganismos contaminantes.

Con el fin de caracterizar a la levadura, se evaluaron los parámetros de crecimiento y consumo de metanol en medio líquido. Se determinó que la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) es de 0.079 h<sup>-1</sup> y se correlacionaron los tres métodos de cuantificación de biomasa empleados (densidad óptica, peso seco y conteo celular) para posteriormente, mediante conteos celulares, realizar estimaciones de la biomasa presente en el biofiltro. En sistemas cerrados (microcosmos), se determinó que la velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ) es de 0.066 g<sub>metanol</sub>/g<sub>biomasa</sub>•h, el coeficiente de mantenimiento ( $m$ ) de 0.024 g<sub>metanol</sub>/g<sub>biomasa</sub>•h, el coeficiente de respiración endógena de 0.0013 gCO<sub>2</sub>/g<sub>biomasa</sub>•h y el coeficiente de conversión de metanol en biomasa ( $Y_{X/S}$ ) de 0.34 g<sub>biomasa</sub>/g<sub>metanol</sub>. Los parámetros de consumo de metanol en medio líquido permitieron estimar el comportamiento de la levadura en el biofiltro. Así, partiendo de  $q_s$  y de la biomasa máxima alcanzada en biofiltro (32.2 mg/g<sub>soporte seco</sub>), se calculó una capacidad de eliminación (CE) máxima de 220 g/m<sup>3</sup>•h y experimentalmente se obtuvo una CE<sub>máx</sub> de 190 g/m<sup>3</sup>•h.

Mediante experimentos de oximetría, se determinó que las concentraciones de metanol a las cuales se registra el mayor consumo de oxígeno son entre 100 – 400 mmol/L (3.2-12.8 g/L) y que aparentemente no hay inhibición a concentraciones hasta de 1526 mmol/L (48.8 g/L). De manera análoga, se determinó que valores de pH entre 2 – 5 no afectan el consumo del metanol. Esta información permitió operar, en los experimentos de biofiltración, a pH ácido y concentraciones de metanol de hasta 400mmol/L (12.8 g/L) (fase líquida + soporte) para así limitar la presencia de microorganismos contaminantes (principalmente bacterias).

Los experimentos de biofiltración se realizaron en columnas con un volumen de 0.2L empleando la perlita y el bagazo de caña como soportes. Los resultados indican que no hay inhibición del metabolismo de la levadura a concentraciones de metanol de hasta 8.7 g/m<sup>3</sup> lo que corresponde, en la fase líquida + soporte, a 314 mmol/L (10 g/L).

Un factor determinante en el comportamiento del biofiltro es el tipo de soporte. Así, la perlita, más que el bagazo, favoreció el proceso de remoción del metanol y la producción de biomasa. Con la perlita se alcanzó una capacidad de eliminación máxima ( $CE_{m\acute{a}x}$ ) de 190 g/m<sup>3</sup>•h durante 48 horas y una densidad de biomasa de 32.2 mg/g<sub>soporte seco</sub>. Con el bagazo de caña se obtuvo una  $CE_{m\acute{a}x}$  de 165 g/m<sup>3</sup>•h por 48 horas y una biomasa de 26 mg/g<sub>soporte seco</sub>. En ambos casos fue posible operar los biofiltros hasta por 22 días sin contaminación aparente.

Debido a la incompleta saturación de humedad de la corriente de alimentación y al calor metabólico generado hubo secado en las columnas. Por ello, se evaluó la recuperación de la eficiencia de remoción adicionando con o sin mezclado agua y/o medio mineral. Se determinó que es suficiente con la adición sin mezclado de la fase líquida. Además, la adición periódica de medio mineral, a diferencia de la adición de agua, promovió que se generara el doble de biomasa (18.5 y 9.57 mg<sub>biomasa</sub>/g<sub>soporte seco</sub> respectivamente).

Respecto al pH, inicialmente su valor en el soporte fue alrededor de 5.0 el cual disminuyó rápidamente hasta alcanzar un valor aproximado de 2.7 debido a la presencia de compuestos intermediarios ácidos poco volátiles: probablemente ácido fórmico. El pH ácido limitó la contaminación bacteriana pero no la fúngica la cual se observó ocasionalmente probablemente por la manipulación de las columnas y a que el aire alimentado al biofiltro no era estéril.

Se escaló el proceso de biofiltración para lo cual se empleó una columna con un volumen útil de 1.1L empacada con perlita. Se alcanzó una  $CE_{m\acute{a}x}$  de  $110 \text{ g/m}^3\cdot\text{h}$  al 9º día y al 12º una coloración negra en la parte superior de la columna indicó una contaminación fúngica.

Se evaluó la capacidad de eliminación de metanol de un hongo aislado e identificado como *Aspergillus sp.* el cual presentó un crecimiento importante en columnas de 0.2L. Se obtuvo una  $CE_{m\acute{a}x}$  de  $235 \text{ g/m}^3\cdot\text{h}$  durante 10 días por lo que este microorganismo representa una alternativa importante en biofiltración convencional para la eliminación del metanol.

Finalmente, resultó importante controlar las condiciones de arranque y de operación del biofiltro. Principalmente, asegurando la saturación de humedad del flujo de alimentación para evitar secado en la columna y por consiguiente adicionar agua lo que representa un riesgo de contaminación.



---

**ABSTRACT.**

Biofiltration is a clean technology in which a microbial consortium is cultivated and immobilized on to a support to eliminate gaseous polluting compounds generating mainly water, CO<sub>2</sub> and biomass.

This work focused on the biofiltration of methanol, a polluting volatile organic compound, mainly emitted by paper mill, wood, painting, pharmaceutical and chemical industries. Unlike for conventional biofiltration, where mixed cultures are used, a pure culture of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* was employed in this work. *P. methanolica* can be modified genetically so, methanol can be the carbon source and the inductor to the heterologous protein production at the same time. It is therefore fundamental, to promote the biomass generation and to limit the presence of contaminant microorganisms to promote its permanence in the biofilter.

In order to characterize the yeast, the growth parameters and methanol consumption in liquid culture were evaluated. The maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) was estimated to be 0.079 h<sup>-1</sup>. The three methods of biomass quantification used were correlated (optical density, dry weight and cellular count) permitting estimate the biofilter biomass by means o cellular counts. From microcosms experiments, it were determinated: the specific methanol consumption rate ( $q_s$ ) of 0.066 g<sub>methanol</sub>/g<sub>biomass</sub>•h, the maintenance coefficient (m) of 0.024 g<sub>methanol</sub>/g<sub>biomasa</sub>•h, the endogenous metabolism coefficient of 0.0013 gCO<sub>2</sub>/g<sub>biomass</sub>•h and the cell yield coefficient ( $Y_{X/S}$ ) of 0.34 g<sub>biomass</sub>/g<sub>methanol</sub>. These parameters allowed to estimate the elimination capacity (EC) expected for the methanol biofiltration. From a  $q_s$  of 0.066 g<sub>methanol</sub>/g<sub>biomass</sub>•h and the maximum biomass reached in biofilter (32.2 mg/g<sub>support dry</sub>), an EC<sub>max</sub> of 220 g/m<sup>3</sup>•h was expected, close to the experimental value of 190 g/m<sup>3</sup>•h.

---

Through oximetry experiments, the major oxygen consumption was registered with methanol concentrations between 100 - 400 mmol/L (3.2 – 12.8 g/L) and apparently, there was no inhibition up to concentrations of 1526 mmol/L (48.8 g/L). In a similar way, it was determined that values of pH between 2 - 5 do not affect the methanol consumption. This information allowed to operate, in the biofiltration experiments, with acid pH and methanol concentrations up to 400mmol/L (12.8 g/L) in the liquid + support phase to limit the presence of contaminant microorganisms (mainly bacteria).

The biofiltration experiments were realized in columns of 0.2L using perlite and sugar cane bagasse as supports. The results indicate that there is no inhibition of the yeast metabolism at concentrations of methanol up to 8.7 g/m<sup>3</sup> in the gas phase.

The methanol removal and the production of biomass were higher with perlite than with sugar cane bagasse. With perlite, an EC<sub>max</sub> of 190 g/m<sup>3</sup>•h was reached during 48 hours and a biomass of 32.2 mg<sub>biomass</sub> /g<sub>support dry</sub> was obtained. With the sugar cane bagasse were obtained an EC<sub>max</sub> of 165 g/m<sup>3</sup>•h for 48 hours and a biomass of 26 mg/g<sub>support dry</sub>. In both cases, it was possible to operate the biofilters for 22 days without apparent contamination.

Due to the incomplete moisture saturation of the gas stream and to the metabolic heat generated, the columns were dried. The recovery of the removal efficiency was obtained by adding water and/or mineral medium. No mixing was needed. Furthermore, the periodic addition of mineral medium, unlike the water addition, promoted the production of biomass.

The biofiltration process was scale up in a column of 1.1L packed with perlite. An EC<sub>max</sub> of 110 g/m<sup>3</sup>•h was reached at the 9<sup>th</sup> day and a black coloration in the top of the column at the 12<sup>th</sup> day indicated a fungi contamination.

Initially, the pH value in the support was 5.0 and diminished quickly until values of 2.7, probably due to the presence of acidic intermediary such as formic acid. The acidic pH

limited the bacterial contamination, but not the fungal contamination observed occasionally, probably, due to the manipulation of the columns and because the gas stream was not sterile. So, it was important to control the conditions of starting and operation of the biofilter. Principally, assuring the moisture saturation of the gas stream to avoid drying in the column and therefore the water addition, which represents a contamination risk.

The methanol elimination capacity, of the fungal contamination in columns of 0.2 L was evaluated for 34 days. An  $EC_{max}$  of  $235 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$  was obtained during 10 days (in literature have been reported values among  $85 - 380 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ ). For that reason this microorganism represents an important alternative in conventional biofiltration for the elimination of methanol. The contaminating fungus was isolated and identified as *Aspergillus sp.*

---



---

**INDICE**

	No.
<b>Resumen</b>	v
<b>Abstract.</b>	viii
<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
1.1 La contaminación ambiental.	1
1.2 Métodos para el tratamiento de efluentes gaseosos de fuentes fijas.	4
1.2.1 Métodos fisicoquímicos.	5
1.2.2 Métodos biológicos	7
1.3 Biofiltración.	9
1.3.1 Parámetros importantes en el proceso de biofiltración.	12
1.3.1.1 Soporte.	12
1.3.1.2 Microorganismos.	13
1.3.1.3 Parámetros ambientales.	14
1.3.2 Modelo teórico.	16
1.3.3 Aplicaciones.	18
1.4 Metanol.	18
1.4.1 El metanol como compuesto contaminante	18
1.4.2 Antecedentes de la eliminación de metanol por biofiltración.	20
1.5 La levadura <i>Pichia methanolica</i> .	21
1.5.1 <i>P. methanolica</i> : microorganismo metilotrófico.	21
1.5.2 <i>P. methanolica</i> para la producción de proteínas heterólogas.	24
1.6 Justificación.	25
<b>2. Objetivos.</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivos generales.	29
3.2 Objetivos particulares.	29
<b>3. Material y métodos.</b>	<b>27</b>
3.1 Material biológico.	27
3.2 Medios de cultivo.	27
3.3 Inóculo.	28

	No.
3.4 Fermentación en medio líquido.	29
3.5 Oximetría.	29
3.5.1 Efecto de la concentración de metanol en el consumo de oxígeno.	30
3.5.1 Efecto del pH en el consumo de metanol	30
3.6 Microcosmos.	31
3.7 Experimentos de biofiltración.	32
3.7.1 Caracterización de los soportes.	32
3.7.2 Sistema experimental.	33
3.8 Isotermas de adsorción del metanol.	36
3.9 Métodos analíticos.	37
3.9.1 Determinación de biomasa.	37
3.9.1.1 Conteo en cámara de Neubauer.	37
3.9.1.2 Peso seco.	38
3.9.1.3 Densidad óptica.	39
3.9.2 Determinación de metanol.	39
3.9.3 Determinación de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> .	40
<b>4. Resultados y discusión.</b>	<b>41</b>
4.1 Isotermas de adsorción del metanol.	41
4.2 Cinéticas de crecimiento y obtención de $\mu_{\text{máx}}$ .	43
4.2.1 Selección de la cepa.	45
4.2.2 Influencia del medio mineral en la tasa de crecimiento.	46
4.3 Efecto de la concentración inicial de metanol en el consumo de Oxígeno	47
4.4 Efecto del pH en el consumo de oxígeno en medio líquido.	52
4.5 Obtención de parámetros cinéticos de consumo de metanol y rendimiento $Y_{X/S}$ .	53
4.5.1 Velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ) y rendimiento $Y_{X/S}$ .	54
4.5.2 Coeficiente de mantenimiento.	58
4.5.3 Coeficiente de respiración endógena.	61
4.6 Experimentos de biofiltración	62

---

	No.
4.6.1 Caracterización de los soportes.	62
4.6.2 Influencia de la carga sobre la eficiencia de remoción.	63
4.6.2.1 Influencia de la concentración de metanol.	63
4.6.2.2 Influencia del flujo de alimentación.	67
4.6.3 Influencia de la adición de agua y/o medio mineral y del mezclado.	70
4.6.4 Influencia del soporte sobre la eficiencia de remoción y la generación de biomasa.	75
4.6.5 Influencia de la adición periódica de medio YNB o agua.	79
4.6.6 Escalamiento del proceso de biofiltración con <i>P. methanolica</i> .	83
4.6.7 Biofiltración fúngica del metanol.	85
<b>5. Conclusiones.</b>	91
<b>6. Bibliografía.</b>	93
<b>7. Anexos.</b>	100
7.1 Técnica de oximetría.	100
7.2 Modelo de Gompertz.	104
7.3 Curva patrón de metanol.	106
7.4 Factores de conversión y curva patrón de CO <sub>2</sub>	107

## **1. INTRODUCCION.**

### **1.1 LA CONTAMINACION AMBIENTAL.**

La mayoría de los procesos industriales, agrícolas, de transporte y de producción de energía producen emisiones gaseosas contaminantes que afectan el medio ambiente, lo cual ha generado una creciente preocupación respecto a la forma de combatirlas.

Los gobiernos han creado programas e instituciones dirigidos a la prevención de emisión de contaminantes al igual que al tratamiento de los mismos. Un ejemplo de ello es la Environmental Protection Agency (EPA) establecida a finales de 1970 en Estados Unidos y que tiene por objetivo hacer investigación, establecer estándares, monitorear emisiones y formular leyes respecto a la emisión de contaminantes al ambiente (Sell, 1992). En México, el organismo encargado de legislar en materia ambiental es la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), es una mega ciudad que afronta uno de los mayores problemas de contaminación del aire. Desde la década de los 60's se empezaron a advertir problemas de contaminación ambiental y en los años 70's se iniciaron esfuerzos aislados para combatirlos. Sin embargo, hasta 1986 se establecen programas orientados al monitoreo y control de la contaminación del aire. En 1990 se instituyó el Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica (PICCA) y, en 1996, se dio a conocer el programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000 (PROAIRE), con el objetivo de disminuir gradualmente los niveles de contaminación. Actualmente se trabaja en el programa PROAIRE 2002-2010, que reúne las acciones que desarrollarán las diferentes dependencias gubernamentales, el sector privado, el educativo y la sociedad en general para lograr la reducción de las emisiones contaminantes que propicien el cumplimiento de las normas de calidad del aire para la protección de la salud (SEMARNAT, 2002).

Con base en la fuente de emisión, los contaminantes que se liberan a la atmósfera pueden catalogarse en 3 grupos: a) emisiones procedentes de fuentes móviles (sector transporte) que emiten, principalmente, bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), monóxido de carbono (CO), bióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) e hidrocarburos totales (HC) que pueden ser compuestos orgánicos volátiles (COV) o no volátiles, partículas de hollín y ozono ( $\text{O}_3$ ); b) emisiones procedentes de fuentes fijas (industria, hogares agricultura y vertederos) como  $\text{CO}_2$ , ( $\text{SO}_2$ ),  $\text{NO}_x$ , HC, metales pesados, clorofluorocarbonos (CFC) y metano ( $\text{CH}_4$ ) y, c) emisiones que surgen de la producción de energía como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  y partículas de hollín (SEMARNAT, 2002).

Los principales problemas de contaminación en la ZMVM son debidos a  $\text{O}_3$  y a partículas suspendidas menores a 10 micrómetros ( $\text{PM}_{10}$ ). Por ello, se ha creado un inventario de emisiones que registra la contribución, de las diferentes fuentes de contaminación, a la presencia de  $\text{PM}_{10}$ ,  $\text{SO}_2$ , CO,  $\text{NO}_x$  e HC en el ambiente. En la tabla 1.1 se presenta el registro de 1998 y en la tabla 1.2 la proyección para el año 2010 basándose en las tendencias del crecimiento poblacional, vehicular y de consumo de combustible (SEMARNAT, 2002). En ambas tablas se observa que los principales generadores de hidrocarburos son las fuentes de área (hogares, comercios y servicios) contribuyendo en un 50% a las emisiones totales seguidas por las fuentes móviles (principalmente autos particulares) con un 40%.

En las tablas 1.3 se presentan los daños a la salud que provocan los contaminantes atmosféricos normados, los cuales afectan principalmente al sistema respiratorio (SEMARNAT, 2002). Además del daño a la salud, los contaminantes ambientales contribuyen a la presencia, cada vez más preocupante, de fenómenos como el calentamiento global, destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida.



Tabla 1.1 Emisión total de contaminantes por fuente, 1998 (SEMARNAT, 2002).

Sector	Toneladas / año				
	PM <sub>10</sub>	SO <sub>2</sub>	CO	NO <sub>x</sub>	HC
Fuentes puntuales	3 093	12 442	9 213	26 988	23 980
Fuentes de área	1 678	5 354	25 960	9 866	247 599
Vegetación y suelos	7 985	N/A	N/A	3 193	15 669
Fuentes móviles	7 133	4 670	1 733 663	165 838	187 773
Total	19 889	22 466	1 768 836	205 885	475 021

N/A: No aplica

Tabla 1.2 Proyección del inventario de emisiones al año 2010 (SEMARNAT, 2002).

Sector	Toneladas / año				
	PM <sub>10</sub>	SO <sub>2</sub>	CO	NO <sub>x</sub>	HC
Fuentes puntuales	5 162	20 824	15 343	44 022	39 884
Fuentes de área	1 824	5 424	26 854	14 198	300 052
Vegetación y suelos	7 985	N/A	N/A	3 193	15 669
Fuentes móviles	10 169	7 053	2 258 255	221 368	241 655
Total	25 139	33 286	2 300 452	282 780	597 260

N/A: No aplica

Tabla 1.3. Contaminantes atmosféricos y sus efectos en la salud. (SEMARNAT, 2002, Molina y Molina, 2002).

Contaminante	Efecto en la salud
O <sub>3</sub>	Daño a las vías respiratorias y al sistema inmunológico. Tos, flemas, atrofia de la mucosa nasal, irritación de ojos, dolor de cabeza y ataques de asma.
PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub>	Padecimientos respiratorios, bronquitis aguda y muerte prematura.
CO	Disminuye la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. Altera el funcionamiento de neuronas, células del corazón y otros músculos.
NO <sub>2</sub>	Problemas respiratorios y muerte celular.
Pb	Inhibe la síntesis de hemoglobina. Causa daño hepático, renal y neurológico.
SO <sub>2</sub>	Irritación del tracto respiratorio, bronco constricción.

## 1.2 METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES GASEOSOS DE FUENTES FIJAS.

Las técnicas de tratamiento de COV's y CIV's pueden catalogarse dentro de dos grupos:

- Métodos fisicoquímicos que pueden ser de destrucción como la incineración o de recuperación como la adsorción, absorción, condensación y separación con membranas.
- Métodos de tratamiento biológico como: biofiltros, biolavadores y biofiltros de lecho escurrido (van Groenestijn y Hesselink, 1993).

Para la elección del método más adecuado para el tratamiento de la corriente contaminada debe considerarse la naturaleza del contaminante, la eficiencia de eliminación deseada, el flujo del gas contaminado y su concentración (van Groenestijn y Hesselink, 1993) según lo muestra la figura 1.1 creada con base en experiencias previas. En ella se observa que los métodos biológicos son aplicables, preferentemente, para emisiones que tienen flujos altos y concentraciones bajas de contaminante.

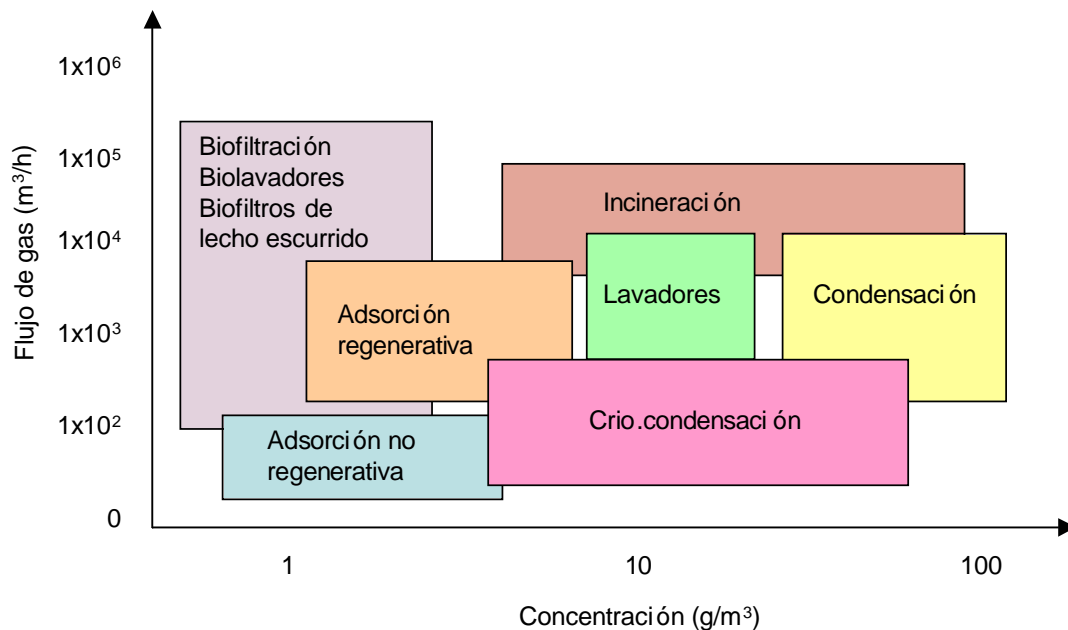


Fig. 1.1. Aplicación de varias tecnologías para el control de contaminación del aire basado en el flujo de aire y la concentración del contaminante (Devinny *et. al.* 1999).

### 1.2.1 METODOS FISICOQUIMICOS.

La aplicación de un método fisicoquímico depende de las propiedades físicas y químicas del contaminante y de la corriente contaminada. Estos métodos han sido muy empleados por ser rápidos y eficientes bajo ciertas condiciones. Sin embargo, tienen la desventaja de altos costos de construcción, energía y agua; además, en muchos casos sólo transfieren el contaminante de un estado físico a otro (Cárdenas *et. al.* 2003). Algunos métodos fisicoquímicos para el tratamiento de gases son:

- **Incineración.**

Existen tres métodos de incineración: de flama directa, la térmica y la catalítica. La incineración de flama directa es el método más simple y se emplea cuando el contaminante reacciona con el aire quemándose. La temperatura típica es de 1400 °C (Sell, 1992). Cuando la corriente de gas a tratar no se quema fácilmente, puede emplearse un gas combustible que caliente el gas (500-800°C) lográndose la degradación térmica de los contaminantes. En la incineración catalítica las moléculas de gas difunden y se adsorben en la superficie del catalizador (platino, paladio o rubidio) el cual permite que la reacción proceda mucho más rápido y/o a menores temperaturas: 300-700°C (Deviny *et. al.* 1999).

La ventaja de la incineración es la alta eficiencia. La incompleta incineración de compuestos orgánicos es la principal desventaja debido a la producción de aldehídos o ácidos que representan un mayor problema de contaminación ó, en el caso de compuestos halogenados o azufrados, la producción de ácido clorhídrico, fluorhídrico, dióxido de azufre y en algunos casos dioxinas (Cárdenas *et. al.* 2003).

Campo de aplicación: Control de olores, destrucción de compuestos tóxicos y reducción de COV's fotoquímicamente reactivos (Cooper y Alley, 1994).

- **Adsorción.**

Se fundamenta en la adherencia de los contaminantes a la superficie de un sólido poroso

por lo que es importante la elección del adsorbente y el tiempo de contacto entre este sólido y el contaminante (Cooper y Alley, 1994). Dependiendo del tipo de enlace entre la molécula de gas y el adsorbente, la adsorción se clasifica en física, si intervienen fuerzas débiles como las de van der Waals ó química si existen enlaces químicos (Cárdenas *et. al* 2003, Lee *et. al.*, 2000).

Los principales materiales adsorbentes son: carbón activado, zeolita hidrofóbica, silica gel ó alumina, todos ellos sólidos con una alta relación superficie-volumen (Dueso, 1994).

Campo de aplicación: Control de olores, purificación de aire con bajas concentraciones de contaminantes y como etapa de preconcentración para después destruir (por incineración, por ejemplo) o recuperar contaminantes como benceno, etanol, tricloroetano, freón (Cooper y Alley, 1994).

- **Absorción.**

Se refiere a la transferencia selectiva de material de un gas a un líquido con el que está en contacto. Se fundamenta en la solubilidad preferencial del componente gaseoso en el líquido (Cooper y Alley, 1994). La eficiencia de la absorción depende de la correcta selección del material absorbente, el coeficiente de transferencia de compuestos orgánicos entre la fase gaseosa y la fase líquida, de la superficie del contacto líquido / gas, la temperatura y del tiempo de contacto (Lee *et. al.*, 2000).

Campo de aplicación: La recuperación de solventes como metanol y acetona se realiza frecuentemente por absorción (Cooper y Alley, 1994).

- **Condensación.**

La condensación separa a uno o más componentes volátiles de una mezcla gaseosa al modificar las condiciones del sistema hasta alcanzar la saturación con el subsecuente cambio de fase. La condensación se logra, ya sea, incrementando la presión por arriba de la presión de saturación, disminuyendo la temperatura por debajo de la temperatura de

saturación (método más usual) o por combinación de las dos (Dueso, 1994) y generalmente se emplea cuando la concentración del contaminante es alta.

### 1.2.2 METODOS BIOLÓGICOS.

Los métodos biológicos de tratamiento de emisiones gaseosas ofrecen la ventaja de bajos requerimientos de energía y materiales así como la producción mínima de desechos en comparación con los métodos fisicoquímicos. Las principales características de estas biotecnologías se presentan en la tabla 1.4

Tabla 1.4 Principales características de los métodos biológicos de tratamiento de emisiones gaseosas (Ottengraff, 1986; Kennes y Thalasso, 1998).

	<b>Fase móvil</b>	<b>Soporte</b>	<b>Biomasa activa</b>
<b>Biolavador</b>	Líquido y gas	Ninguno	Dispersa
<b>Biofiltro de lecho escurrido</b>	Líquido y gas	Sintético	Fija
<b>Biofiltro</b>	Gas	Orgánico/ sintético	Fija

Puesto que en los tres métodos biológicos el contaminante (fase gas) tiene contacto con una fase líquida o una biopelícula (caso de la biofiltración) en la cual se disuelve o difunde, es importante conocer la partición del contaminante entre la fase gaseosa y la líquida. Tal relación es definida por la ley de Henry como se muestra a continuación:

$$P_A = H \cdot X_A \quad (\text{ec. 1})$$

donde:

$P_A$ : presión parcial del compuesto A en la fase gas (atm)

$X_A$ : fracción mol del compuesto A en la fase líquida

H: constante de Henry (Atm/ fracción mol)

Al dividir la ec. 1 entre la presión total del sistema se obtiene  $Y_A = H^* \cdot X_A$  donde  $H^* = H/P_{\text{total}}$  se denomina coeficiente de partición aire/agua y es adimensional (fracción mol de  $A_{\text{aire}}$ /fracción mol de  $A_{\text{agua}}$  ó  $\text{gL}^{-1}_{\text{aire}}/\text{gL}^{-1}_{\text{agua}}$ ) (Yaws *et. al.* 1991)

**Biolavadores.** En los biolavadores, existe una absorción del contaminante en una fase acuosa la cual es entonces y en forma separada tratada biológicamente en la fase líquida del biorreactor. Las principales ventajas de este proceso son: a) remoción de productos de reacción, por ejemplo ácidos, evitando así efectos inhibitorios, b) fácil control del proceso biológico debido al control de la composición del medio líquido y, c) buena capacidad de adaptación de la biomasa microbiana. La parte limitante del proceso es la disolución del contaminante (gas) en la fase líquida, por ello sólo es recomendable cuando el coeficiente de partición aire/agua es menor de 0.01 (Kennes y Thalasso, 1998).

**Biofiltro de lecho escurrido.** Los biofiltros de percolación constan de un soporte en el cual está contenida la biomasa activa siendo el sistema continuamente alimentado con medio líquido el cual provee de nutrientes a los microorganismos. El contaminante gaseoso pasa por el biofiltro en co-corriente o contracorriente respecto a la fase líquida. Las ventajas de los biofiltros de percolación, en comparación con los biofiltros, son: a) fácil eliminación de productos tóxicos debida al paso de la fase líquida, b) fácil control del proceso biológico y, c) buena capacidad de adaptación de la biomasa activa. La transferencia del contaminante de la fase gas a la fase líquida es nuevamente el paso limitante del proceso, por lo que esta tecnología es recomendable para contaminantes con un coeficiente de partición aire/agua menor de 0.1. Un factor que puede significar una desventaja es el excesivo crecimiento de la biomasa en el sistema lo que progresivamente reduce el volumen vacío y puede causar un incremento en la caída de presión (Kennes y Thalasso, 1998).

**Biofiltración.** Un biofiltro es un sistema que contiene un material de empaque en el cual se encuentran soportados microorganismos capaces de consumir el contaminante el cual es transportado en fase gaseosa. Tiene la ventaja respecto al biolavador y al biofiltro de lecho escurrido de requerir un menor consumo de energía debido a que no hay recirculación de una fase acuosa. A diferencia de un biolavador no hay riesgo de lavado de la biomasa presente y no requiere de una etapa previa de transferencia del gas a la fase líquida. Además en un biolavador frecuentemente se requiere airear el sistema para cubrir los requerimientos de oxidación biológica. Sin embargo, esta aereación provoca volatilización de los contaminantes previamente absorbidos.

La biofiltración es aplicable a contaminantes con una constante de Henry menor de 1. Así, se han tratado alcoholes, aldehídos, cetonas, alcanos (heptano, hexano) fenoles hidrocarburos clorados, halogenados y poliaromáticos (Devinny *et. al.* 1999). Esta tecnología es abordada más ampliamente en la siguiente sección.

### **1.3 BIOFILTRACION.**

La biofiltración es una tecnología originada en Europa que se ha empleado para el control de olores en plantas de tratamiento de agua y de procesos de composteo desde hace más de 40 años (Adler, 2001). En los inicios de los 80's su campo de aplicación se amplió a la remoción de compuestos volátiles fácilmente biodegradables provenientes, principalmente, de plantas químicas, fundidoras, imprentas y de pintura (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Actualmente se hacen esfuerzos por aplicar esta tecnología al tratamiento de compuestos volátiles orgánicos, varios hidrocarburos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, estudios más amplios se han realizado para alcoholes, cetonas, alcanos derivados de benceno y compuestos clorados (Kennes y Thalasso, 1998)

El proceso de biofiltración consiste en el uso de uno o varios microorganismos especializados que oxidan el o los compuestos contaminantes generando sustancias menos “dañinas” como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  (van Groenestijn y Hesselink, 1993). El o los contaminantes pasan a través de un material de empaque, también llamado soporte, compuesto de materiales orgánicos (en cuyo caso estos aportan nutrientes a los microorganismos; por ejemplo, composta, aserrín, bagazo de caña, etc.), o de materiales inertes (poli estireno, perlita...) a cuya superficie los microorganismos se encuentran adheridos (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Así, el o los contaminantes (fase gaseosa) deben transferirse primero a una película líquida que rodea a las partículas del empaque para poder estar al alcance de los microorganismos.

Un biofiltro puede ser un sistema abierto o cerrado; los sistemas abiertos exponen la superficie del medio filtrante a la atmósfera mientras que los sistemas cerrados no permiten este contacto al contar con una estructura bien cerrada. Los materiales elegidos para un sistema dependen de las características del gas a tratar, la posible generación de productos finales (tales como ácidos), el grado de control del sistema y el presupuesto del proyecto (Rafson, 1998).

En la figura 1.2 se muestra un esquema básico que ejemplifica un biofiltro real y señala algunos de los principales parámetros.

El aire contaminado puede contener una alta concentración de partículas provocando taponamiento en el sistema, presentar variación en la concentración de los contaminantes a través del tiempo y/o variaciones en la temperatura. Por ello, se puede requerir de etapas de pretratamiento para homogeneizar la corriente de alimentación como se muestra en la fig 1.2. Posteriormente, el aire entra a un sistema de humidificación el cual es el paso crítico en el proceso de pretratamiento de la corriente gaseosa. En el esquema se muestra un sistema con flujo ascendente del gas y, al pasar por el lecho del soporte,



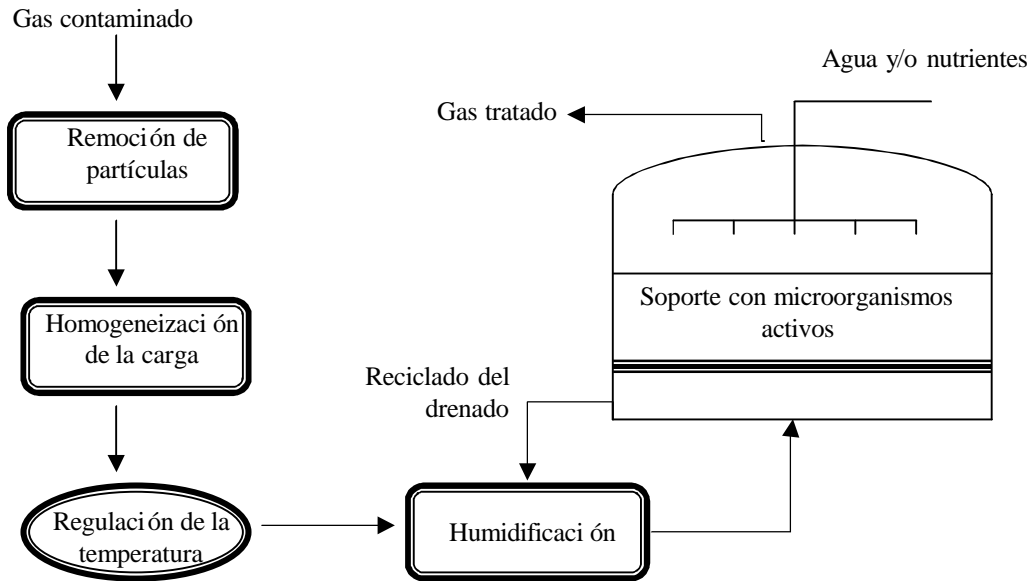


Fig. 1.2. Esquema de un sistema de biofiltración (Swanson y Loehr, 1997)

los microorganismos consumen los contaminantes generando sustancias menos nocivas. Debido a la necesidad de adicionar agua al sistema para contrarrestar los problemas de secado, normalmente se cuenta con un sistema de aspersión de agua o medio mineral en la parte superior del biofiltro. El agua excedente o la generada por el propio proceso puede recuperarse por la parte inferior del biofiltro y reciclarse.

La biofiltración tiene las ventajas de (van Groenestijn y Hesselink, 1993, Kennes y Thalasso, 1998): a) área superficial gas / líquido grande, b) fácil operación y escalamiento, c) altas eficiencias de remoción, d) bajos costos de operación, e) el sistema opera a temperatura ambiente y f) productos residuales poco dañinos para el ambiente ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , biomasa). Sin embargo tiene las desventajas de: a) poco control de las condiciones de reacción, b) lenta adaptación a las fluctuaciones del gas (esto depende principalmente de los microorganismo) y, c) no se puede tratar todo tipo de contaminantes.

### **1.3.1 PARÁMETROS IMPORTANTES EN EL PROCESO DE BIOFILTRACION.**

Los parámetros que tienen impacto sobre el proceso de biofiltración son:

#### **1.3.1.1 SOPORTE.**

Las principales características que un soporte debe tener son (Swanson y Loehr, 1997, Kennes y Thalasso 1998):

- Ambiente óptimo para el crecimiento microbiano, por ejemplo aportación de nutrientes, fuente de carbono, humedad y pH.
- Alta capacidad de retención de agua.
- Gran área superficial para maximizar el área de contacto e incrementar el número de sitios de reacción.
- Baja densidad lo que permite disminuir los costos de instalación.
- Una fracción vacía grande para limitar las caídas de presión y problemas de taponamiento.
- Integridad estructural necesaria para resistir la compactación del medio.

Turba, tierra, composta o una mezcla de ellos son los materiales orgánicos más usados como soportes debido a que proveen todos los nutrientes necesarios para los microorganismos. Sin embargo tienen la desventaja de que a la larga pueden presentar problemas de compactación y caídas de presión.

Una gran variedad de soportes inorgánicos como la perlita, cuentas de vidrio, espuma de poliuretano o poli estireno se han venido empleando, cada vez con más frecuencia, desde la década pasada. La razón de incorporar este tipo de soportes en los biofiltros es limitar las caídas de presión al reducir la compactación, mejorar la porosidad, prevenir la ruptura del soporte y evitar el acanalamiento. Sin embargo en este caso es necesaria la adición de sales minerales.

Últimamente, se ha optado por emplear una mezcla de un soporte orgánico con algún material inorgánico para solucionar los problemas de compactación y de requerimientos nutricionales.

### 1.3.1.2 MICROORGANISMOS.

Para que el proceso de biofiltración sea exitoso se recomienda emplear consorcios microbianos o cultivos puros especializados en el consumo de el o los contaminantes para reducir los periodos de aclimatación. Los microorganismos predominantes en biofiltro tratando COV's son heterótrofos siendo los más comunes las bacterias y los hongos.

Los cultivos puros han sido ampliamente estudiados a nivel laboratorio pero poco usados en aplicaciones a gran escala. Son empleados principalmente en la eliminación de compuestos de difícil degradación. Así, la probabilidad de que un microorganismo más eficiente en el consumo del contaminante aparezca es baja. Ejemplos de cultivos puros empleados en biofiltración se presentan en la tabla 1.5.

Tabla 1.5. Biofiltración con cultivos puros.

Microorganismo	Compuesto contaminante	Referencia
<i>Mycobacterium E3</i>	Eteno	van Groenestijn y Hesselink, 1993
<i>Thiobacillus thioeparus DW44</i>	H <sub>2</sub> S, metanetiolo, dimetil sulfito y dimetil bisulfito	van Groenestijn y Hesselink, 1993
<i>Exophiala jeanselmei</i>	Estireno	Cox <i>et. al</i> 1997
<i>Hyphomicrobium sp.</i>	diclorometano	Kennes y Thalasso, 1998
<i>Rhodococcus sp.</i>	Metil etil cetona	Kennes y Thalasso, 1998
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Metanol	Kennes y Thalasso, 1998
<i>Scedosporium apiospermum TB1</i>	Tolueno	García-Peña <i>et. al.</i> 2001
<i>Candida utilis</i>	Etanol	Christen <i>et. al.</i> 2002

Se ha reportado trabajos en los cuales se emplean hongos en la degradación de varios COV's, particularmente compuestos hidrofóbicos. La razón del creciente interés en estos organismos radica en su resistencia a baja humedad, limitaciones nutricionales y bajo pH, lo que se refleja, en capacidades de eliminación dos o tres veces mayores que con bacterias (Cox *et. al.* 1996, Ergas, 2003). Algunos autores han reportado altas eficiencias de remoción en condiciones ácidas lo cual, generalmente, se ha debido a la presencia de hongos o bacterias extremófilas (Kennes y Thalasso, 1998).

### **1.3.1.3 PARÁMETROS AMBIENTALES.**

La remoción de los compuestos contaminantes en el biofiltro depende de la actividad de los microorganismos presentes y, esta a su vez, de la existencia de condiciones ambientales apropiadas para que los microorganismos crezcan y consuman el contaminante. La humedad, la temperatura, el pH y los nutrientes son los principales parámetros que afectan la actividad microbiana. (Leson *et. al.*, 1991).

El contenido de humedad es normalmente la variable más importante que afecta el comportamiento del biofiltro, ya que la presencia de agua es esencial para asegurar una óptima actividad microbiana. No obstante, una gran cantidad de agua en el biofiltro puede provocar la formación de zonas estancadas o compactadas, problemas de transferencia de oxígeno, generación de zonas anaerobias, incremento de las caídas de presión, y lavado de la biomasa y los nutrientes del sistema. Por otro lado, periodos de secado en la columna de biofiltración causados por variaciones en la humedad relativa de la corriente de alimentación o al calor metabólico generado en la oxidación de los contaminantes, pueden provocar daños irreversibles en la biomasa activa y fraccionamiento del soporte (Cox *et. al.* 1996, Auria *et. al.* 1998, Auria *et. al.* 2000, Morales *et. al.* 2003). Se considera que el contenido de humedad óptimo de un biofiltro se alcanza a la capacidad máxima de retención de agua del soporte, generalmente entre el 40-60% (Swanson y Loehr, 1997). El

control de la humedad del sistema puede realizarse por medio de un sistema de spray dispersando agua directamente en el sistema y/o indirectamente a través de la saturación del aire de la corriente de alimentación en agua (Cox *et. al.* 1996, Kennes y Thalasso 1998, Auria *et. al.* 2000). Desafortunadamente, cambios en el flujo de alimentación y fluctuaciones en la temperatura afectan el control de este parámetro (PPC Air Pollution Control, 2003).

Normalmente los microorganismos empleados en la biofiltración son mesófilos por lo que el rango de temperaturas de crecimiento característico es entre 25-35°C. Sin embargo, también es posible operar biofiltros en condiciones psicrófilas o termófilas, e incluso, ser necesarias estas temperaturas tomando en cuenta la temperatura del gas de alimentación o las condiciones climáticas.

Los procesos de biofiltración son realizados, generalmente, en pH's cercanos a la neutralidad (6-8) los cuales son más adecuados para las bacterias. Por ello, la generación de ácidos, bases u otros productos inhibitorios son indeseables y se debe evitar que la acumulación de alguno de ellos afecte el comportamiento de la biomasa lo que se vería reflejado en caída de la eficiencia de remoción. Como es muy difícil regular el pH durante el proceso de biofiltración, el parámetro que suele ser de gran importancia para controlarlo es la elección del soporte, ya sea al elegir uno con capacidad amortiguadora o al realizar un pretratamiento del mismo mezclándolo con  $\text{CaCO}_3$  (polvo de conchas de ostra, por ejemplo) o soluciones de  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{NaHPO}_4$ .

Finalmente, cuando se emplean soportes orgánicos estos proporcionan los nutrientes necesarios para los microorganismos. Sin embargo, en el caso de soportes inertes o del empleo a largo plazo (años) de soportes orgánicos, puede ser necesario adicionar al sistema soluciones de N y/o P tales como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; así como S, Mg y ciertos elementos traza (principalmente para el funcionamiento de ciertas enzimas) ya que la

deficiencia de estos nutrientes se traduce en disminución en la eficiencia de remoción (Acuña *et. al.* 1999, Prado *et. al.* 2002, Yang *et. al.* 2002).

### 1.3.2 MODELO TEORICO.

Diversos modelos teóricos han sido propuestos para describir el proceso de biofiltración siendo la principal diferencia entre ellos la descripción esquemática de la biocapa (donde se encuentran los microorganismos) y el orden que se asume en la cinética de degradación del contaminante (Kennes y Thalasso 1998). El primer modelo teórico de un biofiltro es el que desarrollaron Ottengraf y van den Oever en 1983. Las suposiciones de las cuales parten son (Ottengraf y van den Oever, 1983):

- Los sustratos (fuente de carbono, oxígeno y nutrientes) son transportados en la biocapa por difusión, la cual puede ser descrita por el coeficiente de difusión efectivo. Además, se asume que las concentraciones del contaminante en la fase gaseosa y líquida están siempre en equilibrio y definidas por la ley de Henry.
- El espesor de la biocapa es pequeño comparado con el diámetro de las partículas del empaque (biopelícula plana).
- El espesor de la biocapa es constante a lo largo de todo el biofiltro.
- La micro cinética de la biodegradación del sustrato en la biocapa puede ser descrita por una expresión de tipo Monod.

$$k = k_{\max} \frac{C_L}{K_M + C_L}$$

donde:  $C_L$ : concentración del contaminante en el medio líquido (mol/L)

$k_{\max}$ : velocidad máxima de degradación (mol/ L seg.)

$K_M$ : constante de saturación

Si la  $C_L \ll K_M$  la cinética se puede simplificar a una cinética de orden uno.

Si la  $C_L \gg K_M$  la cinética se puede simplificar a orden cero (la velocidad de degradación es independiente de la concentración del contaminante)

- El flujo de la fase gas a través del lecho es de tipo pistón.

Así, este modelo sugiere que (Leson *et. al.*, 1991, Devinny *et. al.*, 1999):

- A una concentración de la fase gas,  $C_g$ , superior a la concentración crítica  $C^*$ , la biocapa está completamente saturada del contaminante (fig 1.3 y fig 1.4) y, la velocidad de remoción estará limitada por la actividad biológica de los microorganismos. En tal caso se trata de una reacción de pseudo-orden cero y la velocidad de degradación no cambiará con la concentración (degradación con limitación por reacción).
- A concentraciones menores de la concentración crítica, la difusión del contaminante en la biocapa será el paso limitante para la remoción, es decir, si la biocapa no es completamente penetrada por el contaminante, la velocidad de remoción es aproximadamente proporcional a la concentración del contaminante (reacción de 1<sup>er</sup> pseudo-orden). Fig. 1.3 y 1.4.

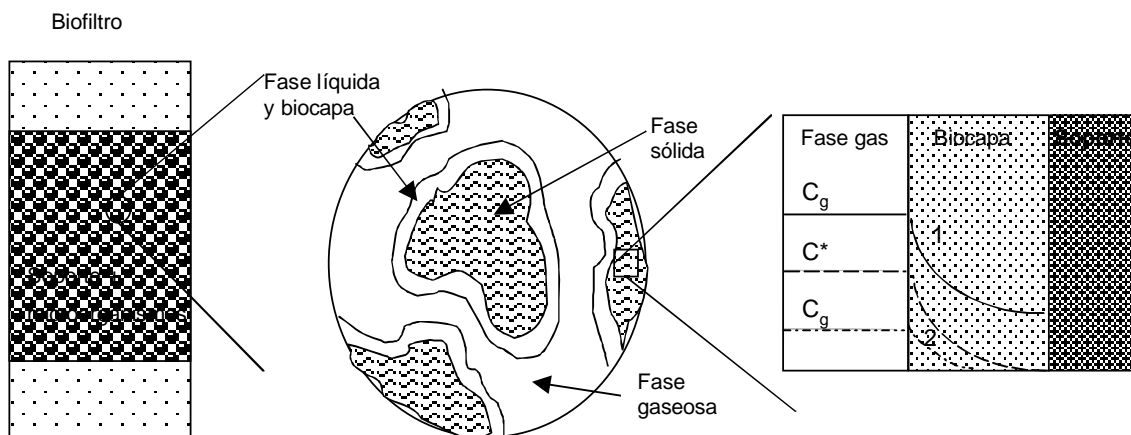


Fig. 1.3 Modelo conceptual de la biofiltración. Los perfiles que se muestran en la biocapa se refieren a: 1) degradación con limitación por reacción y, 2) degradación con limitación por difusión.  $C^*$ : concentración crítica (Leson *et. al.*, 1991, Ergas, 2003).

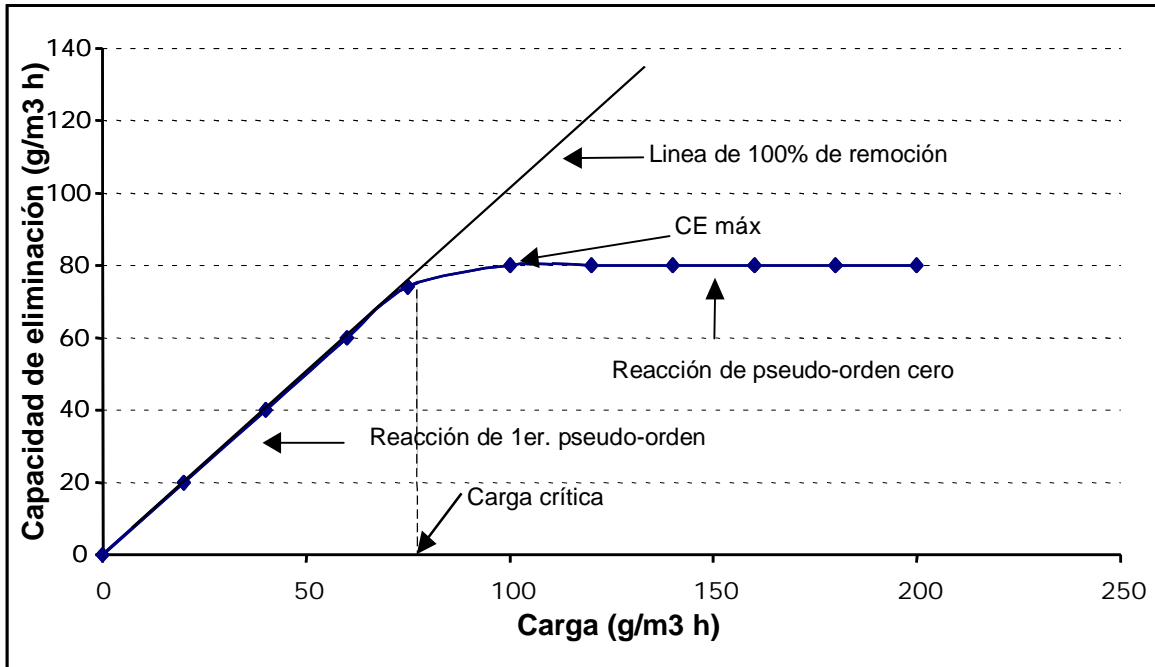


Fig. 1.4 Ejemplificación de perfiles de capacidad de eliminación en reacción de pseudo-orden cero y de primer pseudo-orden (Ergas, 2003).

### 1.3.3 APLICACIONES.

Diversos son los trabajos que se han realizado a escala piloto y a nivel industrial en el tratamiento de emisiones gaseosas. En la tabla 1.6 se muestra una relación de algunos resultados obtenidos al aplicar la biofiltración a nivel industrial.

## 1.4 METANOL.

### 1.4.1 EL METANOL COMO COMPUESTO CONTAMINANTE.

El metanol es un alcohol cuya fórmula química es  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Es un compuesto orgánico volátil ampliamente empleado alrededor del mundo y liberado al ambiente por industrias tales como la del papel, madera, pinturas, farmacéuticas y químicas. Se ha empleado principalmente como solvente; como anticongelante en radiadores de automóviles y constituye una alternativa como combustible. Las fuentes naturales de este alcohol son



Tabla 1.6. Experiencias prácticas en el tratamiento biológico de gases en la industria

Compuesto	Tipo de industria	Velocidad de flujo ( $\text{m}^3\text{h}^{-1}$ )	Carga	Eficiencia de eliminación (%)
COVs <sup>(1)</sup>	Tanques de almacenamiento	2 000	$8 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{h}$	90
COVs <sup>(1)</sup>	Tratamiento de aguas industriales	65 000	$31 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{h}$	70-90
COVs <sup>(1)</sup>	Procesamiento del pescado	6 300	$105 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{h}$	95
COVs <sup>(1)</sup>	Procesamiento del pescado	10 300	$184 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{h}$	85
Aromas <sup>(3)</sup>	Composteo	357 143	Nd	86
Aromas <sup>(3)</sup>	Sabores y fragancias	56 122	Nd	90
COV's y BTEX <sup>(3)</sup>	Petróleo	510	Nd	80 - 95
Tolueno, fenol y acetona <sup>(4)</sup>	Plásticos	1 000	Nd	80 - 95
Carbón orgánico <sup>(4)</sup>	Farmacéutica	1 000	Nd	99.9
Solventes <sup>(4)</sup>	nd	140 000	Nd	> 95
Aromas <sup>(4)</sup>	Composteo	16 000	Nd	> 95
Alcoholes <sup>(1)</sup>	Fundidora	30 000	$150 \text{ m}^3/\text{m}^3\cdot\text{h}$	>99
Etanol <sup>(2)</sup>	Fundidora	nd	$180 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$	80 - 90

<sup>(1)</sup>van Groenestijn y Hesselink, 1993, <sup>(2)</sup>Leson *et. al.*, 1995, <sup>(3)</sup>Rafson, 1998, <sup>(4)</sup>Adler, 2001.

nd: no disponible

las emisiones de gases volcánicos, la extracción de petróleo crudo y gas natural y la descomposición biológica de lodos y aguas de drenaje (EPA, 2002).

El metanol es un compuesto hidrofílico considerado dentro de los 189 contaminantes peligrosos del aire (hazardous air pollutants, HAPs) enlistados en la Clean Air Act Amendment (CAAA90) propuesta por la Environmental Protection Agency (Mohseni y Grant, 2000) y se estima que sus emisiones al aire en América del Norte fueron de 104,031 toneladas en 1999 (CEC, 1999).

Este alcohol puede entrar al organismo por vía respiratoria, cutánea o por ingestión. Los efectos en la salud por exposición a concentraciones elevadas de metanol (mayor de 200

ppm en aire), en centros de trabajo o por accidente, incluye náusea, vómito, irritación en ojos, nariz y boca, desordenes visuales, ceguera temporal o permanente, daño al sistema nervioso, depresión cardiaca y daño hepático. Este solvente puede causar daños al feto y puede reaccionar en el aire para producir formaldehído, un compuesto catalogado como cancerígeno. Especificaciones de la Occupational Safety and Health Administration (OSHA) permiten una exposición máxima a metanol en el aire de 200 ppm por un periodo 8 horas (EPA. 1994).

El grupo  $-OH$  le confiere al metanol una gran capacidad hidrofílica (alta solubilidad en agua). Sin embargo, por ser un compuesto de bajo peso molecular es una sustancia muy volátil (temperatura de ebullición:  $64.7^{\circ}C$  a 1 atmósfera) de tal forma que, el metanol se evapora cuando se expone al aire y se disuelve completamente cuando es mezclado con agua. La constante de Henry del metanol es de  $5.2 \times 10^{-6} \text{ atm}/(\text{mol}/\text{m}^3)$  lo que equivale a  $4784.7 (\text{g}/\text{m}^3)_{\text{liq}} / (\text{g}/\text{m}^3)_{\text{gas}}$  (Rafson, 1998).

#### **1.4.2 ANTECEDENTES DE LA ELIMINACION DE METANOL POR BIOFILTRACION.**

Diversos han sido los trabajos realizados acerca de la biofiltración del metanol. En la tabla 1.7 se resumen algunos de los resultados obtenidos en estos estudios.

Un antecedente directo al presente trabajo, es el realizado por Cornabe *et. al* (2002) en el cual se utilizó una cepa de *Pichia pastoris* previamente transformada para producir una lacasa. En él se obtuvo una capacidad máxima de eliminación de  $175 \text{ g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  durante 5 días.

Adicionalmente, Adler *et. al.* (2001), reportan y comparan costos capitales y de operación de la biofiltración respecto a tecnologías fisicoquímicas para el tratamiento de emisiones de metanol los cuales se presentan en la tabla 1.8.

Tabla 1.7. Antecedentes de biofiltración de metanol.

Microorganismos	CE <sub>max</sub> (g/m <sup>3</sup> h)	Referencia
Consortio de 8 bacterias.	113	Shareefdeen <i>et.al.</i> 1993
Consortio de microorganismos no identificados	173	Thalasso <i>et.al</i> 1999
Consortio de microorganismos no identificados.	135-150	Deshusses <i>et. al.</i> 2000
Bacterias	101	Krailas <i>et. al</i> 2000
Consortio de microorganismos no identificados.	200-250	Mohseni y Grant, 2000
Bacterias	100	Kong <i>et. al.</i> 2001
Consortio de microorganismos no identificados	85	Arulneyam y Swaminathan 2003
Consortio	380	Sologar <i>et. al.</i> 2003

Tabla 1.8 Costos de instalación y operación de varias tecnologías para el control de emisiones de metanol (Concentración: 129 mg/m<sup>3</sup>, flujo: 169,900 m<sup>3</sup>/h) (Adler *et. al.*, 2001).

Tecnología	Eficiencia (%)	Costo de instalación (\$ Dls).	Costo de operación anual (\$ Dls).
Biofiltro	95	962 500	204 743
Biofiltro	95	1 500 000	385 114
Biofiltro	95	1 885 000	456 235
Concentrador + oxidación catalítica	95	1 405 000	296 767
Concentración + oxidación térmica	95	2 987 000	757 085
Oxidación térmica regenerativa	90	1 600 000	834 900
Oxidación térmica regenerativa.	95	1 905 000	963 290

## 1.5 LA LEVADURA *Pichia methanolica*.

### 1.5.1 *P. methanolica*: MICROORGANISMO METILOTROFICO.

Se denomina organismos metilotróficos a aquellos capaces de utilizar el metanol como única fuente de carbón y energía. Este tipo de microorganismos fue primeramente identificado a finales de los 60's e inicios de los 70's; era en la cual la producción y el empleo del metanol se vieron ampliamente favorecidos. Los microorganismos metilotróficos pueden ser bacterias, hongos (Duff y Murray, 1988, Woodward, 1989) o

levaduras de las cuales las más ampliamente investigadas pertenecen a los géneros *Pichia* y *Hansenula*.

*Pichia methanolica* fue descrita por primera vez por Kato y col. en 1974 y desde 1977 se ha realizado investigación de esta levadura en diversas instituciones, principalmente en Rusia (Klaus, 1996).

Originalmente, la razón por la cual *P. methanolica* ha sido tan investigada es que ofrece la simplicidad y economía de un sistema de expresión bacteriano (hay una rápida y alta producción de proteínas heterólogas) y la posibilidad de modificaciones postraduccionales propias de un organismo eucariótico. Además, permite realizar un conveniente y útil análisis genético usando herramientas clásicas, incluyendo el mapeo genético. (Invitrogen, 2003).

*P. methanolica* es una levadura aerobia cuya temperatura de crecimiento óptima oscila entre 28 a 30°C con un pH óptimo entre 3 a 6.5. En el caso de *Pichia pastoris*, una levadura del mismo género, se ha reportado que puede crecer en medio líquido en concentraciones altas de metanol. Así, Cornabe *et al.* (2002) reportan que puede crecer en concentraciones de 625 mmol/L (20 g/L) mientras que Duff y Murray (1988) emplearon concentraciones de hasta 1563 mmol/L.(50 g/L).

En la fig. 1.5 se presenta la ruta metabólica de oxidación biológica del metanol por *P. methanolica*. En ella, el alcohol entra a los peroxisomas (estructuras especializadas) y es oxidado por oxidasas específicas para generar formaldehído y peróxido de hidrógeno, este último es descompuesto en agua y oxígeno molecular por una catalasa peroxisomal. El formaldehído generado por la reacción de la oxidasa sale al citosol, en donde por medio de una ruta de degradación produce energía y por otra ruta (asimilación) produce biomasa. La reacción clave en esta última ruta es la catalizada por la dihidroxiacetona sintetasa, realizada en peroxisoma, produciendo dihidroxiacetona y gliceraldehido-3-fosfato (esta es una reacción transacetolasa entre el formaldehído y xilulosa-5-fosfato).

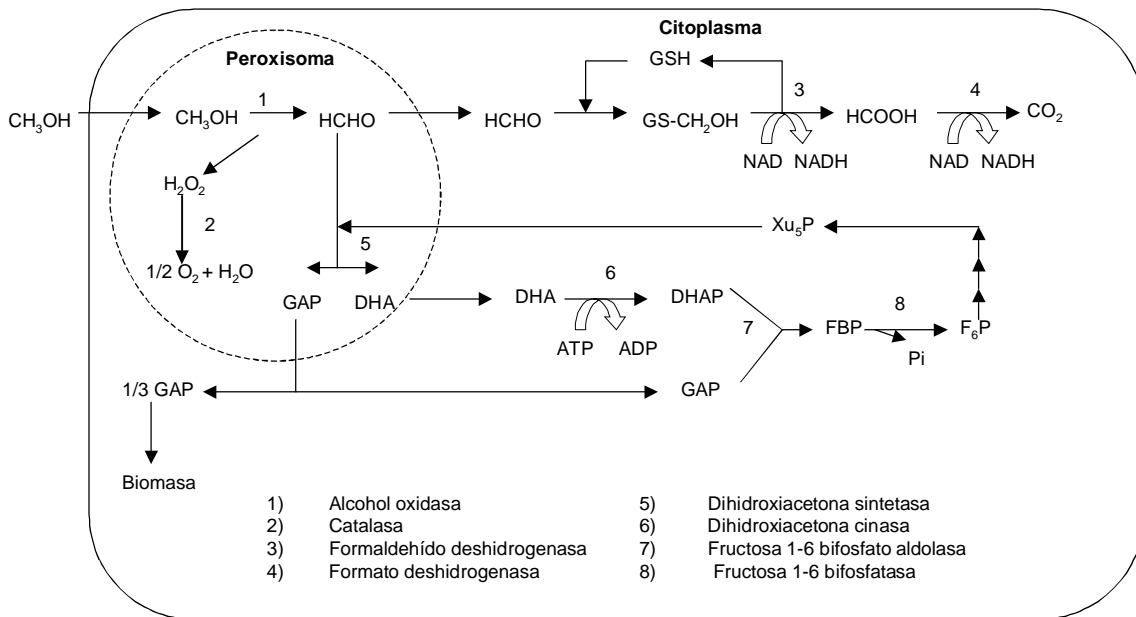


Fig. 1.5 Rutas para la utilización del metanol en metilótrofos (Wolf, 1996; Gellissen, 2000).

La dihidroxiacetona es fosforilada por la correspondiente cinasa para posteriormente, mediante una condensación aldólica con el gliceraldehído-3-fosfato, generar una molécula de fructosa 1,6-bisfosfato la cual es convertida en fructosa-6-fosfato por una fosfatasa. La xilulosa-5-fosfato es regenerada de 2 moléculas de fructosa-6-fosfato y una de triosa fosfato en las reacciones de la parte no oxidativa del ciclo de la pentosa fosfato catalizada por transaldolasa, transcetolasa, ribosa-5-fosfato isomerasa y ribulosa-5-fosfato epimerasa. Una tercera parte del gliceraldehído -3-fosfato generado es destinado a la formación de biomasa por reacciones de gluconeogénesis. En la ruta de degradación, el formaldehído es catabolizado por la acción de dos subsecuentes deshidrogenasas; en el primer paso el formaldehído es oxidado a formiato por una formaldehído deshidrogenasa para ser posteriormente oxidado a bióxido de carbono por una formiato deshidrogenasa. Se ha determinado que en cultivos creciendo en metanol, los peroxisomas proliferan pudiendo ocupar hasta el 80% del volumen celular, por su parte, la alcohol oxidasa y la

dihidroxiacetona sintetasa pueden constituir del 60–80 % de la proteína celular. (Faber, 1995; Wolf, 1996; Gellisen, 2000).

### **1.5.2 *P. methanolica* PARA LA PRODUCCION DE PROTEINAS HETEROLOGAS.**

Las razones por las que *Pichia* resulta ser un hospedero ideal para la producción de proteínas heterólogas es porque: a) es un microorganismo capaz de crecer con altas densidades celulares, en medios definidos y económicos, b) la expresión de las proteínas heterólogas es regulada fuertemente por el promotor del gen de la alcohol oxidasa, c) por ser la levadura un organismo eucariótico, es capaz de muchas de las modificaciones postraduccionales necesarias en proteínas de animales superiores y d) las levaduras son capaces de secretar, en altos niveles, muchas proteínas lo que simplifica los procesos de purificación de las mismas (d'Anjou y Daugulis, 2000, Invitrogen 2003).

Se ha identificado que existen dos genes que codifican para la enzima alcohol oxidasa a partir de los cuales se generan 9 isoformas con idéntico peso molecular (450 kDa) pero diferente carga (pI 4.18-5.2) y  $K_m$  0.5-5.5 mM (metanol como sustrato). La razón de tal heterogeneidad molecular es la diferencia en la sustitución de algunos aminoácidos en la proteína codificada (Ashin y Trotsenko 2000). Los 2 genes que codifican para la alcohol oxidasa se denominan AUG1 y AUG2 (alcohol utilization gene) siendo, al parecer, el gen AUG1 el responsable de la mayoría de la actividad enzimática de las alcohol oxidasas. Este gen ha sido aislado y existen plásmidos que emplean el promotor de este gen para expresar proteínas heterólogas de interés. Así, además de ser fuente de carbono para *P. methanolica*, el metanol es un inductor (por medio del gen AUG1) para la producción de altos niveles de alguna proteína de interés (producción de 10 a 100 veces más proteína en comparación con *Saccharomyces*) (Invitrogen, 2001).

Se ha reportado el empleo de *Pichia* en la producción de la enzima lacasa, glucoamilasa, glutamato descarboxilasa humana, la leptina humana, antígeno de superficie de la hepatitis B, factor de crecimiento epidérmico, invertasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ 1-antitripsina, endostatina, etc, así como su potencialidad como fuente de proteína unicelular (Cereghino y Cregg, 2000, Cornabe *et.al* 2002, Gellisen, 2000, Faber *et. al.*, 1995).

Adicionalmente, la alcohol oxidasa, es una enzima de particular interés como herramienta biotecnológica debido a su relativa no especificidad y porque es estable bajo un amplio rango de condiciones. Entre los usos potenciales de esta enzima se encuentran: cuantificación de alcohol, para esterilización (a través de la liberación de formaldehído) de materiales sensibles al calor o la radiación, para la producción de saborizantes y como parte de un sistema de recuperación de etanol (Duff y Murray, 1988)

## 1.6 JUSTIFICACION.

Puesto que:

- La biofiltración es una tecnología limpia y económica en el tratamiento de COV's.
- El metanol es un COV contaminante y
- *P. methanolica* es un microorganismo especializado en el consumo de metanol;

se plantea el presente trabajo de investigación que tiene por finalidad evaluar la capacidad de eliminación del metanol en un biofiltro inoculado con un cultivo puro de *P. methanolica* generando altas densidades celulares. A la par, este proyecto permitirá explorar la posibilidad futura de transformar este microorganismo para producir una proteína heteróloga de interés.

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la capacidad de la levadura *Pichia methanolica* para eliminar el metanol mediante biofiltración y generar en el sistema altas densidades celulares.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

2.2.1 Obtener parámetros de crecimiento y consumo de metanol por *P. methanolica* en medio líquido como son:

- Velocidad de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ).
- Rendimiento de conversión de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s}$ ), velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ) y respiración endógena.
- Efecto de la concentración de metanol y pH en el consumo de metanol por *P. methanolica*.

2.2.2 Evaluar la capacidad de consumo de metanol por *P. methanolica* en un biofiltro.

- Evaluar la capacidad máxima de eliminación de metanol.
- Obtener altas densidades celulares.
- Evaluar la influencia del soporte y de las condiciones de alimentación del reactor.
- Evaluar la influencia de la adición de agua, medio mineral y del mezclado en el comportamiento del biofiltro.
- Limitar la presencia de microorganismos contaminantes mediante la concentración de metanol y el pH en el biofiltro.



### 3. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se usaron dos cepas de la levadura *Pichia methanolica* denominadas PMAD11 y PMAD16 (Invitrogen 2003). Ambas provienen de una cepa CBS6515 (ATCC 58372). La levadura PMAD16, resultado de la mutación de la cepa PMAD11, es una levadura deficiente de proteinasaA y proteinasaB por lo que es recomendable para la expresión intracelular de proteínas heterólogas mientras que la cepa PMAD11 se prefiere cuando la proteína a expresar es extracelular.

#### 3.2 MEDIOS DE CULTIVO.

##### Medio de mantenimiento e inóculo.

En ambos casos, el medio empleado fue el Yeast Peptone and Dextrose (YPD) (Invitrogen 2003) cuya composición se muestra en la tabla 3.1

Tabla 3.1 Composición del medio de mantenimiento e inóculo.

Compuesto	Medio de mantenimiento (%)	Medio de inóculo (%)
Extracto de levadura	1	1
Peptona de caseína	2	2
Dextrosa	2	2
Agar	2	-

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. La solución de dextrosa se debía esterilizar por separado y una vez fríos los compuestos se mezclaban.

##### Medios minerales para el cultivo.

Se usaron dos medios minerales y en ambos casos, el metanol fue la fuente de carbono. Uno de los medios minerales empleado fue el propuesto por Cornabé *et.al.* (2001) (MM)

---

---

Composición en g/L:  $K_2HPO_4$ , 1.74;  $(NH_4)_2SO_4$ , 3;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.051;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.246;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.069;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.043;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.0277;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.112. El medio se esterilizó a 121°C por 15 min.

El segundo medio mineral empleado fue el Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (YNB) de Difco, concentración de 6.7 g/L y pH final  $5.4 \pm 0.2$  a 25°C (The Difco Manual, 2002).

El medio se esterilizó a 121°C por 15 min. (no por filtración como lo marca el proveedor). Durante los experimentos de biofiltración se empleo medio YNB 5 veces concentrado (33.5 g/L).

### **3.3 INOCULO.**

La levadura se almacenó en el medio de mantenimiento en tubos inclinados a 4°C. Cada 3 a 4 meses se realizaron resiembras en medio fresco.

Para las fermentaciones en medio líquido primero se reactivaba creciéndola en YPD, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapones de algodón con un volumen útil de 100 mL, durante 20 horas. Después, con este medio se inoculaba el medio YNB (matraz Erlenmeyer de 500 mL, vol. útil de 200 mL) con una tasa de inóculo 5% v/v adicionando metanol, 368.7 mmol/L, e incubando por unas 40 horas (fase exponencial de la levadura). Para poder usar esta biomasa como inóculo, debía lavarse primero con solución salina isotónica estéril (NaCl 9 g/L) 3 veces.

Para los experimentos de microcosmos y oximetría la levadura se creció como se explicó pero la biomasa proveniente del medio YPD se lavó con solución salina estéril (NaCl 9 g/L) 3 veces para después inocular el medio YNB. El lavado tiene por objeto eliminar azúcares residuales.

Para inocular las columnas de biofiltración se empleó levadura crecida en YPD.

El proceso de incubación fue en todos los casos a 30°C y 200 r.p.m.

### **3.4 FERMENTACION DE MEDIO LIQUIDO.**

Para determinar la velocidad máxima de crecimiento de *P. methanolica*, se realizaron fermentaciones en medio líquido. Se emplearon matraces nefelométricos de 500 mL con un volumen útil de 200 mL de medio mineral y con tapones de algodón. Se inoculó con un volumen tal que al tiempo inicial la biomasa fuera de  $1 \times 10^7$  células/mL lo que equivale a una D.O de 0.107. Para ello se hicieron conteos previos del inóculo. Se contó además con un blanco en el cual la biomasa se substituyó por agua destilada estéril. La concentración inicial de metanol fue de 369 mmol/L (11.8 g/L) la cual se definió con base en la literatura (Duff y Murray 1988, Hoop *et. al.* 1991, Klaus 1996, d'Anjou y Daugulis, 1997, Zhang *et. al.* 2000, Cornabe *et al.* 2002, Mayson *et. al.* 2003, Trinh *et. al.* 2003).

El seguimiento de la fermentación se realizó: a) por densidad óptica tomando lecturas cada 2 horas, b) por conteo celular cada 2 horas y c) por peso seco cada 24 horas.

Cuando se observaba que se detenía el crecimiento de la levadura (la lectura de densidad óptica se estabilizaba), se adicionaba metanol al medio para asegurar que no había una limitación por fuente de carbono. El experimento se realizó por duplicado.

### **3.5 OXIMETRIA.**

Para determinar las condiciones de concentración de metanol y pH que permiten un mayor consumo de metanol así como aquellas que resultan inhibitorias se realizaron experimentos de oximetría. Se realizaron en un monitor de oxígeno biológico YSI modelo 5300 con un electrodo de Clark. El equipo mide el consumo de oxígeno que, en medio líquido, realizan sistemas biológicos. La técnica al detalle se presenta en el anexo 7.1.

### 3.5.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN EL CONSUMO DE OXÍGENO.

Se probaron concentraciones de metanol desde 123 mmol/L hasta 1475 mmol/L con incrementos de 123 mmol/L. La concentración exacta de metanol en las soluciones se verificó por cromatografía de gases.

La biomasa se resuspendió en una solución a pH 3.5 y a la concentración de metanol a evaluar. En estas condiciones las levaduras se dejaron por 45 a 60 minutos para su adaptación. La biomasa así tratada se empleó para medir el consumo de oxígeno en el oxímetro. Se contó con un blanco (sin metanol) que permitió evaluar la respiración endógena de la biomasa. Cada corrida tenía una duración de 20 a 30 minutos. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 3.5.2 EFECTO DEL pH EN EL CONSUMO DE METANOL.

Se prepararon 8 soluciones de buffer de fosfatos de pH 2, 3, 3.5 ,4.2 y 5 como se muestra en la tabla 3.2

Tabla 3.2 Buffer de fosfatos empleados en oximetría

pH	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mL/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)
2	0.49	5.44	-
3.02	0.27	5.44	-
3.47	0.1	5.44	-
4.18	-	5.44	-
5.05	-	5.168	0.09

Las células se resuspendían en cada una de estas soluciones y se les adicionaba metanol para alcanzar una concentración de 368.7 mmol/L. En estas condiciones la biomasa permanecía de 45-60 minutos en un proceso de adaptación.

Además de las muestras así preparadas, se monitoreaba el consumo de oxígeno en un blanco a pH 3.5 (sin metanol) para determinar la respiración endógena. Las lecturas se realizaron por duplicado.

### 3.6 MICROCOSMOS.

Para evaluar el consumo de metanol y oxígeno así como la producción de CO<sub>2</sub> en medio líquido por *P. methanolica* se hicieron experimentos en microcosmos. Se emplearon botellitas serológicas de aproximadamente 125 mL tapadas herméticamente con válvulas Mininert donde el volumen de la fase líquida fue de 5 mL (Figura 3.1). El volumen exacto de cada botella se evaluó tomando el peso de la botella llena de agua destilada y restándole el peso de la botella vacía.



Fig. 3.1 Sistema de microcosmos.

La forma como se armó cada experimento se muestra en la tabla 3.3. Se usó YNB, NaCl 9 g/L, metanol 369 mmol/L y una tasa de inóculo de 2% (la biomasa se cuantificó por peso seco). Las botellas se armaron en condiciones estériles y se incubaron a 30°C y 200 r.p.m. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 3.3 Experimentos en microcosmos

Parámetro a determinar	Condición
Velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ) y rendimiento $Y_{X/S}$	YNB + metanol + inóculo
Coefficiente de mantenimiento	NaCl + metanol + inóculo
Respiración endógena	YNB + inóculo
Blanco	YNB + metanol

Se monitoreó el consumo de oxígeno y metanol así como la producción de bióxido de carbono por cromatografía de gases cada 12 ó 24 horas. Una vez que se detectaban concentraciones bajas de oxígeno, que podrían ser limitantes para el proceso, se procedía a renovar el aire del microcosmos para lo cual se abría y deja airear la botella en una campana de flujo laminar por 30-45 minutos. Después de este periodo la botella se cerraba y se le volvía adicionar metanol para alcanzar la concentración inicial (369 mmol/L). Así se pudo evaluar el metanol,  $O_2$  y  $CO_2$  en ciclos consecutivos y ver la repetibilidad de los mismos.

### 3.7 EXPERIMENTOS DE BIOFILTRACIÓN.

#### 3.7.1 CARACTERIZACION DE LOS SOPORTES.

Los materiales empleados como soporte fueron la perlita y el bagazo de caña. La caracterización consistió en:

- **Tamaño de partícula.** Para la perlita se empleó un tamiz de 2.36 - 4.76 mm. El bagazo de caña se tamizó con malla de 1 - 4-76 mm. Se lavó con abundante agua destilada y se secó a 100°C por 24 horas. Ambos soportes se esterilizaron, a 121°C por 15 minutos, para su uso en biofiltro.

- **Densidad aparente.** Para hacer esta determinación se empleó una probeta seca de 250 mL ( $V_P$ ) la cual se pesó ( $P_P$ ), se llenó de soporte seco a la marca y se volvió a pesar ( $P_{P+S}$ ). La densidad aparente ( $\rho_{aparente}$ ) se determinó mediante la fórmula:

$$\rho_{aparente} = \frac{P_{P+S} - P_P}{V_P} \cdot en \cdot g/mL$$

- **Densidad del soporte húmedo.** Se empleó una probeta seca de 250 mL ( $V_P$ ) de peso conocido ( $P_P$ ) y se llenó de soporte seco. Se adicionó agua a la probeta y se tapó. Se dejó así por un día y al siguiente se permitió que drenara el agua en exceso, de modo que solo quedara el soporte saturado de agua, se peso ( $P_{P+Shúmedo}$ ). La fórmula para determinar la densidad del soporte húmedo es:

$$\rho_{soporte \cdot húmedo} = \frac{P_{P+S \text{ húmedo}} - P_P}{V_P} \cdot en \cdot g/mL$$

- **Capacidad máxima de retención de agua ó humedad de saturación (CRA).** Se parte de los pesos obtenidos anteriormente y se aplica la siguiente fórmula:

$$CRA = \frac{(P_{P+S \text{ húmedo}} - P_P) - (P_{P+S \text{ seco}} - P_P)}{P_{P+S \text{ húmedo}} - P_P} \times 100 \cdot en\%$$

### 3.7.2 SISTEMA EXPERIMENTAL.

Un esquema del sistema experimental se muestra en la figura 3.2. La temperatura en el sistema fue de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Las columnas de biofiltración empleadas fueron de vidrio de un diámetro interno de 4.5 cm y una altura de 14.5 cm; el volumen total fue de 0.23L y el volumen de trabajo de 0.2L. En la siguiente etapa de escalamiento, las dimensiones de la columna fueron 7.5 cm de diámetro interno y 32 cm de altura por lo que el volumen total era de 1.4L sin embargo el volumen de trabajo fue de 1.1L.

Las condiciones iniciales fueron: biomasa,  $1 \times 10^7$  células /g<sub>soporte seco</sub> lo que equivale a 0.419 mg<sub>biomasa</sub>/ g<sub>soporte seco</sub> (en el caso de bagazo de caña) y de 0.364 mg<sub>biomasa</sub>/ g<sub>soporte seco</sub> (si el soporte es perlita). La humedad del sistema se controló al 66-67% (sección 4.6.1) adicionando el inóculo y medio YNB (33.5 g/L) necesario. Así, al inicio en la columna con bagazo de caña había 35.4 g de agua y en la empacada con perlita 42.9 g. Para montar las columnas se emplearon soportes, YNB y agua esterilizados a 121°C por 15 minutos. Sin embargo, no se esterilizó el aire de alimentación.

Los experimentos se realizaron por duplicado a excepción del escalamiento.

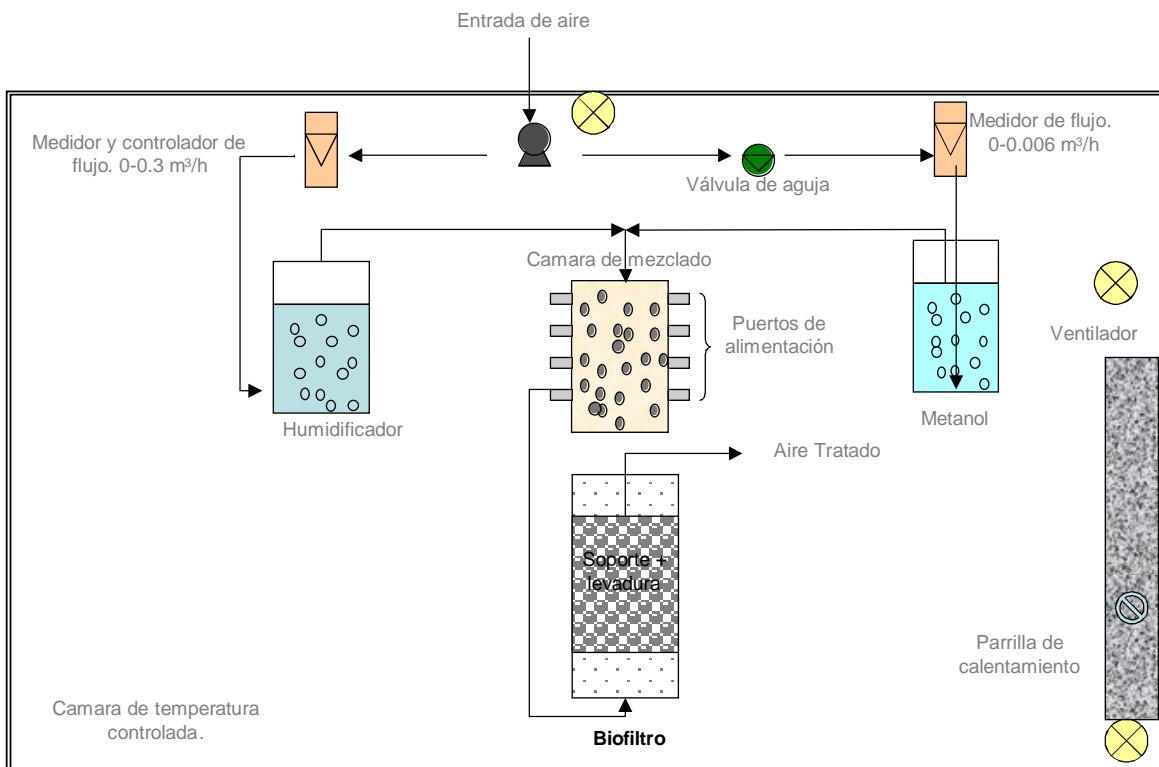


Fig. 3.2 Esquema del sistema experimental.

Al tiempo inicial se determinó el pH (mediante un potenciómetro Conductronic pH 20) para lo cual a 1g del soporte inoculado se le adicionaba 5 mL de agua destilada y después se media el pH.



Cuando se requirió hacer una evaluación del pH, biomasa y humedad tanto en etapas intermedias como al final de los experimentos de biofiltración, se desmontaba la columna, se mezclaba el soporte y se tomaba una muestra homogénea. Todo en condiciones estériles.

En los experimentos en que se evaluó la influencia de la adición de agua y/o medio YNB con o sin del mezclado, adición con mezclado se refiere a que la columna se desempacaba, se adicionaba el líquido, se homogeneizaba perfectamente y se volvía a empacar. Adición sin mezclado significa que sólo se destapa la columna y, por la parte superior, se añadía el medio YNB y/o agua necesaria evitando el drenado del líquido. En ambos casos el volumen adicionado fue entre 12 – 15 mL por columna, todo bajo condiciones estériles. En algunos casos se evaluó la adición periódica de medio YNB o agua (sin mezclado). Esto se realizó en condiciones estériles y el volumen adicionado fue normalmente de 5 mL por columna.

A lo largo de los experimentos, se fue monitoreando diariamente la concentración de metanol a la entrada y salida, la producción de CO<sub>2</sub> y la generación de intermediarios volátiles mediante cromatografía de gases. La entrada se monitoreaba tomando una muestra directamente de la corriente de alimentación. La salida se monitoreaba tomando una muestra en un bulbo de vidrio de 0.5L, el cual se conecta a la corriente de salida por 20 a 30 minutos para garantizar una muestra representativa del sistema.

Los datos de las fases gaseosas eran traducidos, finalmente, en carga (L), eficiencia de remoción (ER) y/o capacidad de eliminación (CE) mediante las siguientes fórmulas:

$$L = \frac{(C_o)(F)}{V} \cdot \text{en} \cdot \frac{\text{g}_{\text{metanol}}}{\text{m}^3\text{h}}$$

$$\text{ER} = \frac{C_o - C_f}{C_o} \times 100 \cdot \text{en} \cdot \%$$

$$CE = \frac{(C_o - C_f)F}{V} \cdot \text{en} \cdot \frac{\text{g}_{\text{metanol}}}{\text{m}^3\text{h}}$$

donde:  $C_o$ : Concentración a la entrada ( $\text{g}/\text{m}^3$ )  
 $C_f$ : Concentración a la salida ( $\text{g}/\text{m}^3$ )  
 $F$ : Flujo de alimentación ( $\text{m}^3/\text{h}$ )  
 $V$ : Volumen de empaque ( $\text{m}^3$ )

### 3.8 ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DEL METANOL.

Se determinó la distribución, en el equilibrio, del metanol en sistemas líquido/ gas y líquido+sólido/ gas. Aunque en el primero se presentan un fenómeno de absorción y en el segundo de absorción y adsorción, en adelante la distribución del metanol en ambos sistemas se referirá sólo como adsorción (isotermas de adsorción).

El experimento se hizo en condiciones abióticas y por duplicado en botellas serológicas de 125 mL tapadas herméticamente con válvulas Mininert. Se evaluó la distribución del metanol en 5 sistemas:

- 1.- Agua desionizada/ gas
- 2.- Medio YNB 1.34 g/L / gas
- 3.- Medio YNB 6.7 g/L / gas
- 4.- Perlita + medio YNB 6.7 g/L / gas
- 5.- Bagazo de caña + medio YNB 6.7 g/L / gas

En los primeros 3 sistemas el volumen de la fase líquida fue de 10 mL.

En los soportes, el volumen ocupado por la fase líquida+sólida se estimó de dos maneras:

- a) considerando la densidad real de los soportes ( $\rho_{\text{real perlita}}$ : 1.64 g/mL y  $\rho_{\text{real bagazo}}$ : 1 g/mL) y su CRA (tabla 4.8). Así, se determinó que el volumen ocupado fue de 3.05 mL para la perlita y de 2.9 mL para el bagazo. A partir de estos datos y las lecturas de metanol se obtuvieron las isotermas de adsorción. La razón de emplear la densidad real

de los soportes es que este parámetro no depende del grado de compactación ni del tamaño de partícula del soporte.

b) partiendo de los valores de densidad del soporte húmedo y de la CRA (tabla 4.8). Con ellos, se determinó que el volumen ocupado fue de 10 mL en ambos casos. La distribución del metanol en estos casos permitió estimar, en los experimentos de biofiltración, la concentración del metanol en la fase líquido + sólido, a partir de mediciones en la fase gaseosa.

Para cada sistema se evaluaron 3 concentraciones de metanol que fueron 246, 369 y 615 mmol/L (10, 15 y 25 mL/L) las cuales se alcanzaron, para cada caso, mediante la adición subsecuente de metanol en las botellas. Una vez armados los sistemas en condiciones estériles para evitar contaminación microbiana, se incubaron a 30°C y 200 r.p.m. por 2 horas. En cada caso se determinó la concentración de metanol en la fase gaseosa y en los casos que lo permitían, el metanol en fase líquida, todo mediante cromatografía de gases.

### **3.9 METODOS ANALITICOS.**

#### **3.9.1 DETERMINACION DE BIOMASA.**

La determinación de biomasa en medio líquido se hizo por peso seco, conteo celular y densidad óptica. En los biofiltros se hacían conteos celulares los cuales se reportaban  $\text{mg/g}_{\text{soporte seco}}$  empleando la correlación presentada en la fig 4.3 y la  $\rho_{\text{aparente}}$  del soporte.

##### **3.9.1.1 CONTEO EN CAMARA DE NEUBAUER.**

1) Se toma una alícuota representativa de la muestra, se le adiciona un volumen conocido de agua y se sonica en un equipo Branson Ultrasonics 3200 por 15 minutos

para deshacer los agregados de levaduras y, en el caso de muestras de biofiltro, desprender la biomasa del soporte.

- 2) Después de una dilución adecuada, con una pipeta Pasteur se coloca una muestra de esta solución en la cámara de Neubauer y se observa al microscopio con el objetivo de 40X. Un número de levaduras por cuadro mayor de 30 o menor de 5 es un indicativo de que la dilución no es la correcta.
- 3) Se realiza el conteo al microscopio de 13 cuadros de la cámara elegidos de manera alternada. Se determina el número de células por mililitro empleando la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{No. de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número total de células}}{\text{Número de cuadros}} \times 25 \times \text{factor de dilución} \times 1 \times 10^4$$

El factor  $1 \times 10^4$  se obtiene de considerar que el volumen de muestra que se pone en la cámara Neubauer es de 0.1 microlitros, es decir,  $1 \times 10^{-4}$  mL. Así, para referenciar el conteo de células a mililitros, se debe multiplicar por  $1 \times 10^4$ .

En el caso de la determinación de biomasa en muestras de biofiltro, primero se hace un conteo celular y la biomasa se reportaba como  $\text{mg/g}_{\text{soporte seco}}$  empleando la relación  $\text{biomasa (g/L)} = 6.99 \times 10^{-9}(\text{cel/mL}) + 3.07 \times 10^{-2}$  presentada en la fig 4.3 y la  $\rho_{\text{aparente}}$  del soporte.

### 3.9.1.2 PESO SECO.

- 1) Se pone el papel filtro a peso constante. Se usan filtros membrana Durapore® tipo HVLP de 0.45  $\mu\text{m}$  de Millipore (USA), los cuales se dejan en la estufa a  $100^\circ\text{C}$  por 24 horas. Después de este plazo, los papeles se sacan de la estufa y se ponen en un desecador por 10-15 minutos para que se enfríen. Se procede a pesarlos en una balanza analítica Ohaus modelo Galaxy™160.

- 2) Se filtra la muestra líquida (5 - 20 mL) al vacío empleando el papel filtro del paso anterior.
- 3) Se seca la muestra en la estufa a 100°C por 24 horas.

La biomasa se reporta en gramos por litro.

$$Biomasa \frac{g}{L} = \frac{(g_{papel\ filtro\ solo} + muestra) - (g_{papel\ filtro\ solo})}{Vol \cdot muestra(L)}$$

### 3.9.1.3 DENSIDAD OPTICA.

La densidad óptica se evaluó en un espectrómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) a una longitud de onda de 600 nm. Siempre se contó con un blanco trabajado en la misma forma que la muestra con la diferencia que en el primero se substituyó el volumen de biomasa del problema con agua destilada. En caso de que la densidad superara el valor de 0.6 se hacen diluciones.

### 3.9.2 DETERMINACION DE METANOL

El metanol gaseoso en todos los experimentos a excepción de los de biofiltración, se determinó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama modelo Hewlett Packard 5890 equipado con una columna de metil silicón de 30m de largo x 0.25µm de película y diámetro interno 0.32µm (Quadrex Corporation). El gas acarreador fue nitrógeno (1.8 mL/min). Las condiciones de operación fueron: temperatura de inyección 180°C, temperatura del horno 40°C y temperatura del detector 190°C.

En los experimentos de biofiltración, la determinación de metanol se realizó en un cromatógrafo de Agilent Technologies 6890N con detector de ionización de flama equipado con una columna AT™-WAX de 25m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.2 µm de película. Las temperaturas de operación fueron: inyector 160°C, columna 65°C

y detector 250°C. El volumen de inyección en ambos casos fue de 250  $\mu$ L para lo cual se uso una jeringa de gases Hamilton de 1 mL.

Cuando se requirió determinar metanol en fase líquida se empleó un estándar interno el cual fue una solución de isopropanol (15mL/L). Este se mezcló en relación 1:1 con la muestra problema. Volúmenes entre 0.1 y 0.2  $\mu$ L se inyectaban en el cromatógrafo.

Los datos de área proporcionados por el cromatógrafo, se traducen en concentración de metanol mediante el uso de curvas patrón (anexo 7.3).

### **3.9.3 DETERMINACIÓN DE CO<sub>2</sub> Y O<sub>2</sub>**

Se empleó, en todos los casos a excepción de la biofiltración, un cromatógrafo de gases Gow-Mac Series 550 con detector de conductividad térmica equipado con una columna concéntrica CTR1 (Alltech) teniendo como gas acarreador helio (65 mL/min) y al nitrógeno del aire como estándar interno (78.9%). Las condiciones de operación fueron: temperatura de inyección 30°C, temperatura del horno 40°C y temperatura del detector 150°C. La corriente fue de 100 mA.

Para los experimentos en biofiltro se uso el cromatógrafo de Agilent Technologies 6890N con detector de conductividad térmica. Se usó una columna Porapak Q 80/100 de 6 pies de largo por 1/8'' de diámetro interno. Las temperaturas de operación fueron: 160°C en el inyector, 65°C en el horno y 200°C en el detector. Se uso nitrógeno como gas acarreador. El volumen de inyección fue 250  $\mu$ L. La obtención de factores de conversión (cromatógrafo Gow-Mac Series 550) o curva de calibración (cromatógrafo Agilent Technologies 6890N) se muestra en el anexo 7.4

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

El desarrollo del trabajo experimental se dividió en dos fases.

En una primera etapa, se determinaron los parámetros de crecimiento y consumo de metanol en medio líquido por *P. methanolica*, así como la influencia de la concentración de metanol y el pH en la velocidad de consumo de oxígeno.

En la segunda etapa, se evaluó el comportamiento de *P. methanolica* cultivada en un sistema de biofiltración con particular interés en la influencia de los fenómenos de secado (y por consiguiente de la humidificación) así como del medio mineral sobre el proceso.

### 4.1 ISOTERMAS DE ADSORCION DEL METANOL.

Se determinó la isoterma de adsorción del metanol en sistemas líquido/ gas y sólido+líquido/ gas. El metanol en fase líquida es el metanol disponible para ser consumido por la levadura ya que esta crece en medio líquido.

Las isotermas de adsorción y los coeficientes de partición se muestran en la figura 4.1 y tabla 4.1

El coeficiente de partición experimental en el agua desionizada fue de 3812.7  $(\text{g}/\text{m}^3)_{\text{agua}}/(\text{g}/\text{m}^3)_{\text{gas}}$  evaluada a 0.77 atm y 30°C. Rafson (1998) reporta, para este parámetro, un valor de 4784.7  $(\text{g}/\text{m}^3)_{\text{agua}}/(\text{g}/\text{m}^3)_{\text{gas}}$  a 1 atm y 30°C. La diferencia cuantitativa entre ambos valores seguramente se debe a que la presión en el sistema experimental no es la misma.

Los coeficientes de partición del metanol en los sistemas medio YNB (1.34 g/L) /gas y medio YNB (6.7 g/L) /gas, no presentan una diferencia significativa respecto al obtenido en el sistema agua desionizada/metanol, lo que indica que la adición de sales (a baja concentración) no modifica la partición del metanol entre la fase líquida y la gaseosa.

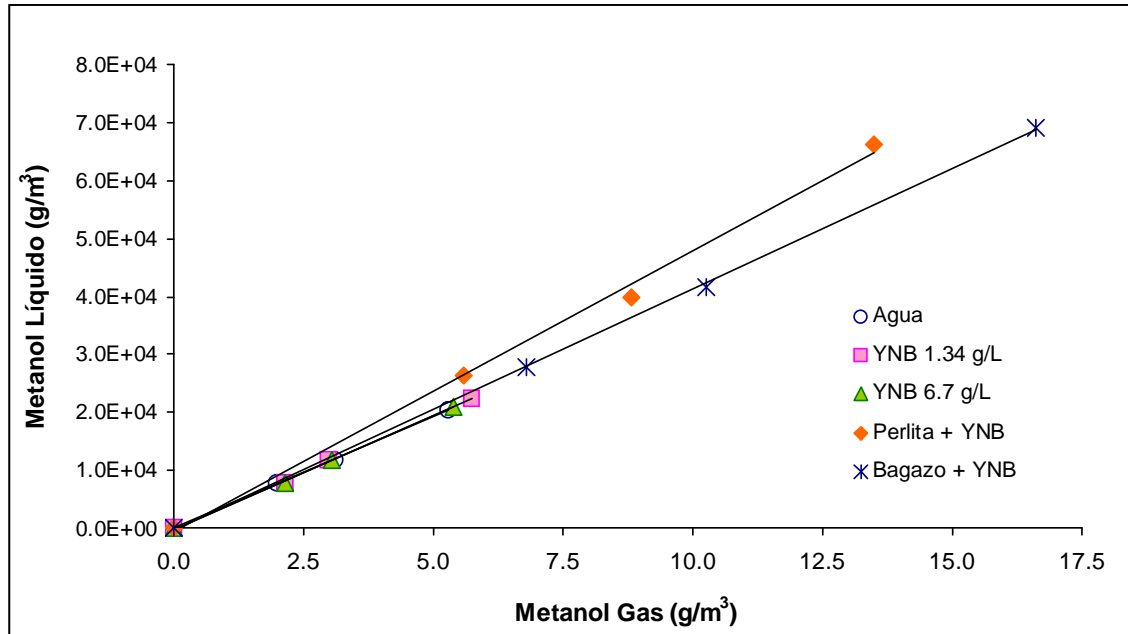


Fig. 4.1 Isotermas de adsorción de metanol.

Tabla 4.1 Coeficientes de partición.

Condición.	Coefficiente de partición [(g/m <sup>3</sup> ) <sub>líq. o líq.+sólido</sub> / (g/m <sup>3</sup> ) <sub>aire</sub> ]
Agua desionizada/ gas	3812.7
Medio YNB 1.34 g/L / gas	3919.0
Medio YNB 6.7 g/L / gas	3898.2
Perlita + medio YNB 6.7 g/L / gas	4854.9
Bagazo de caña + medio YNB 6.7 g/L / gas	4158.9

En todos los casos  $r^2 > 0.99$

Los coeficientes de partición en los sistemas sólido + líquido son superiores a los determinados en medio líquido, debido seguramente a que en estos sistemas se presentan simultáneamente fenómenos de absorción y adsorción.

Adicionalmente, considerando la densidad del soporte húmedo y la CRA (sección 3.8) se determinó para cada soporte un coeficiente de partición. La importancia de evaluar estos coeficientes radica en la posibilidad de estimar, en los experimentos de



biofiltración, la concentración de metanol en la fase líquida + soporte una vez cuantificada la concentración del metanol en la fase gaseosa. El valor de los coeficientes es:  $1423.2 \text{ (g/m}^3\text{)}_{\text{líquido + soporte}} / \text{(g/m}^3\text{)}_{\text{aire}}$  para la perlita y  $1165.2 \text{ (g/m}^3\text{)}_{\text{líquido + soporte}} / \text{(g/m}^3\text{)}_{\text{aire}}$  para el bagazo de caña. La razón de que estos coeficientes sean tan distintos a los presentados en la tabla 4.1 se debe a que en los primeros, al considerar la densidad del soporte húmedo, se considera el grado de compactación y de tamaño de partícula del soporte.

#### 4.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y OBTENCION DE $\mu_{\text{máx}}$ .

La evaluación del crecimiento de *P. methanolica* en medio líquido se realizó normalmente por densidad óptica (D.O). Además, se realizó una cinética en la que a la par de medir por D.O se hicieron mediciones de peso seco y conteos celulares lo que permitió establecer una correlación entre cada parámetro. La finalidad de contar con esta información, fue la de poder realizar estimaciones de la biomasa presente en los experimentos de biofiltración partiendo de conteos celulares ó lecturas de densidad óptica (ver fig. 4.2 y 4.3).

Invitrogen (2003) reporta que para *P. methanolica*, una densidad óptica de 1 equivale a aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/mL. Empleando las correlaciones de las figuras 4.2 y 4.3 se obtiene que una densidad óptica de 1 equivale a  $4.5 \times 10^7$  células/mL. De esta forma se validan las correlaciones obtenidas.

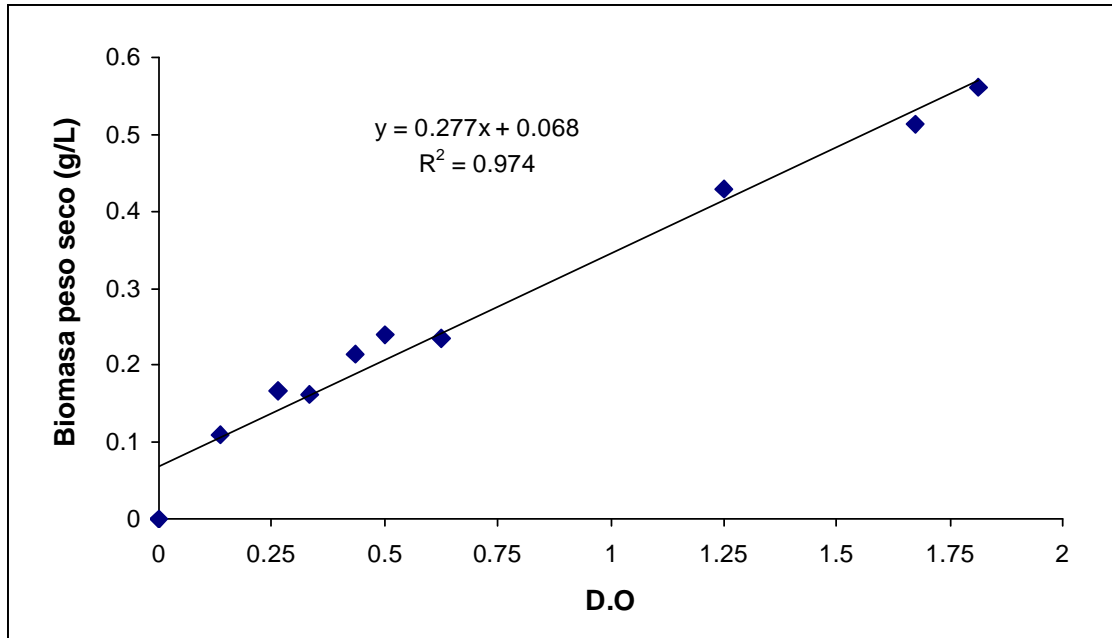


Fig. 4.2 Correlación biomasa (g/L) vs. D.O

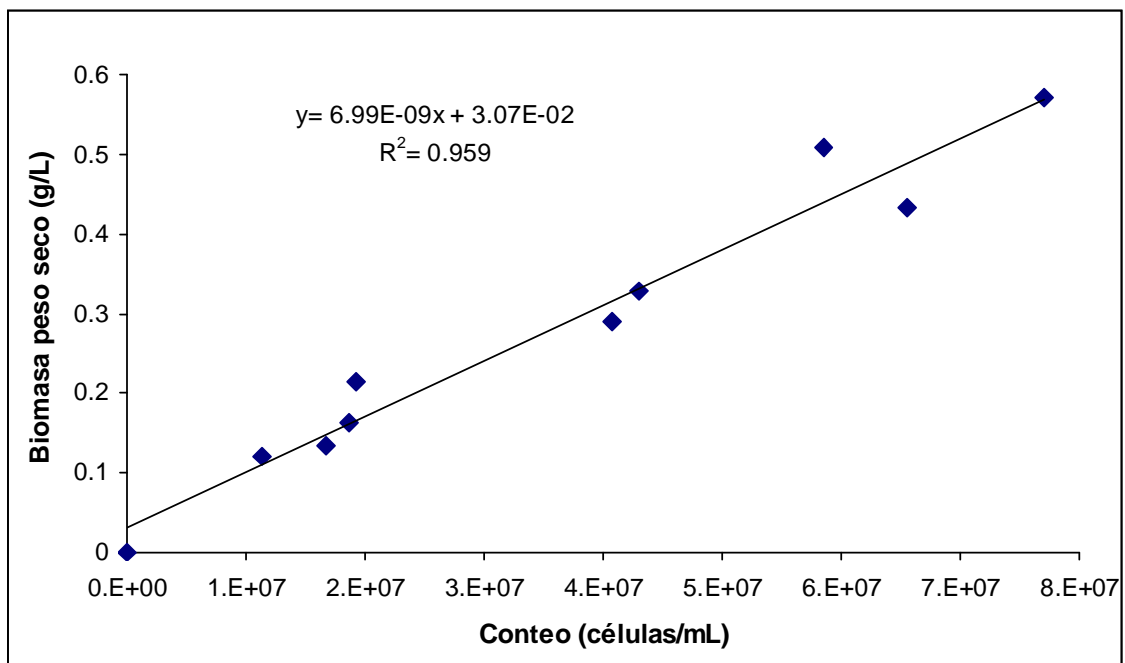


Fig. 4.3 Correlación biomasa (g/L) vs. conteo (células/mL).

#### 4.2.1 SELECCION DE LA CEPA.

Con el objeto de seleccionar una cepa (PMAD11 o PMAD16) para este proyecto, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido. Puesto que en el proceso de biofiltración es importante contar con una gran cantidad de biomasa activa en el menor tiempo, el criterio de selección fue la velocidad de crecimiento.

En la fig 4.4 se presenta la curva de crecimiento de ambas cepas. La concentración inicial de metanol fue de 369 mmol/L (11.8 g/L) definida con base en la literatura (sección 3.4).

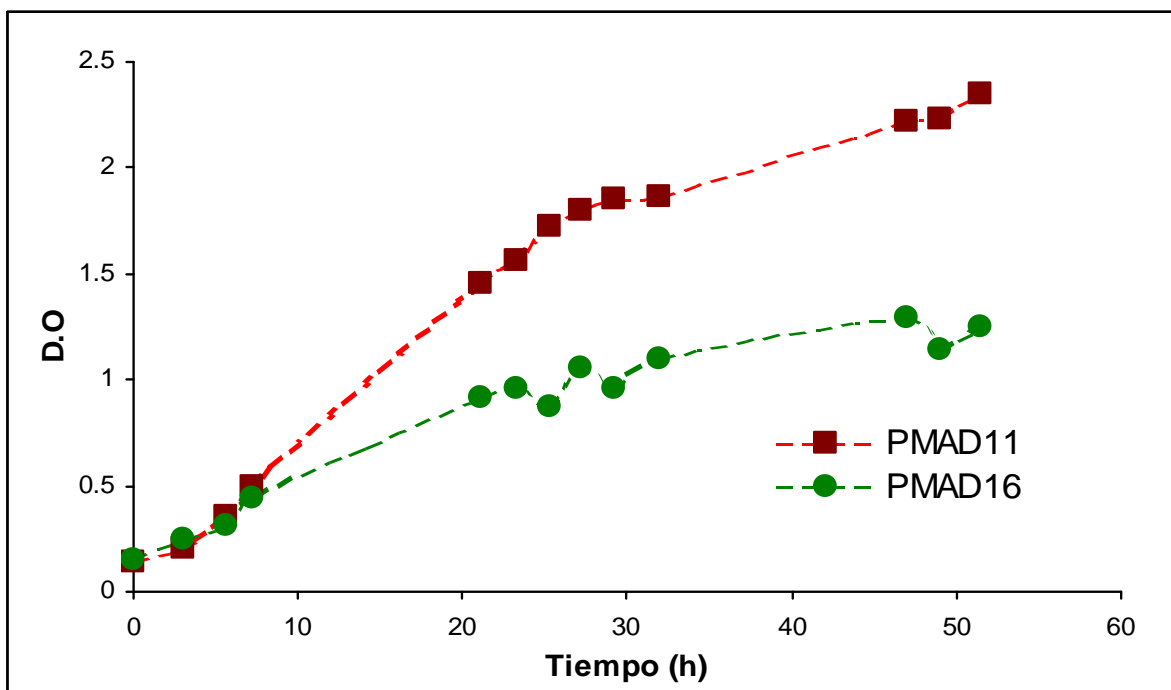


Fig. 4.4 Cinética de crecimiento de PMAD11 y PMAD16. (Metanol inicial:369 mmol/L).

Al final de la cinética, la concentración de biomasa estimada (correlación figura 4.3) fue de 0.71 g/L en el caso de la cepa PMAD11 y de 0.40 g/L para la cepa PMAD16.

La tasa de crecimiento de la cepa PMAD11 fue de  $0.083\text{h}^{-1}$  mientras que la de la cepa PMAD16 fue de  $0.063\text{h}^{-1}$  por lo que se seleccionó la cepa PMAD11. Este resultado

concuera con lo reportado por Invitrogen (2003), que especifica que la cepa PMAD16 crece más lentamente que la cepa PMAD11.

#### 4.2.2 INFLUENCIA DEL MEDIO MINERAL EN LA TASA DE CRECIMIENTO.

Inicialmente se planteó el empleo de dos medios minerales para el crecimiento de la levadura: el medio MM y el YNB. Se realizaron cinéticas para determinar cual medio favorecía el crecimiento de *P. methanolica*, con la cepa PMAD11 previamente seleccionada (ver figura 4.5). A las 70 horas aproximadamente, se observó que la biomasa formaba agregados (principalmente en el medio YNB) y se adhería a las paredes del matraz lo cual impidió, en las siguientes mediciones, realizar una correcta lectura de la D.O.

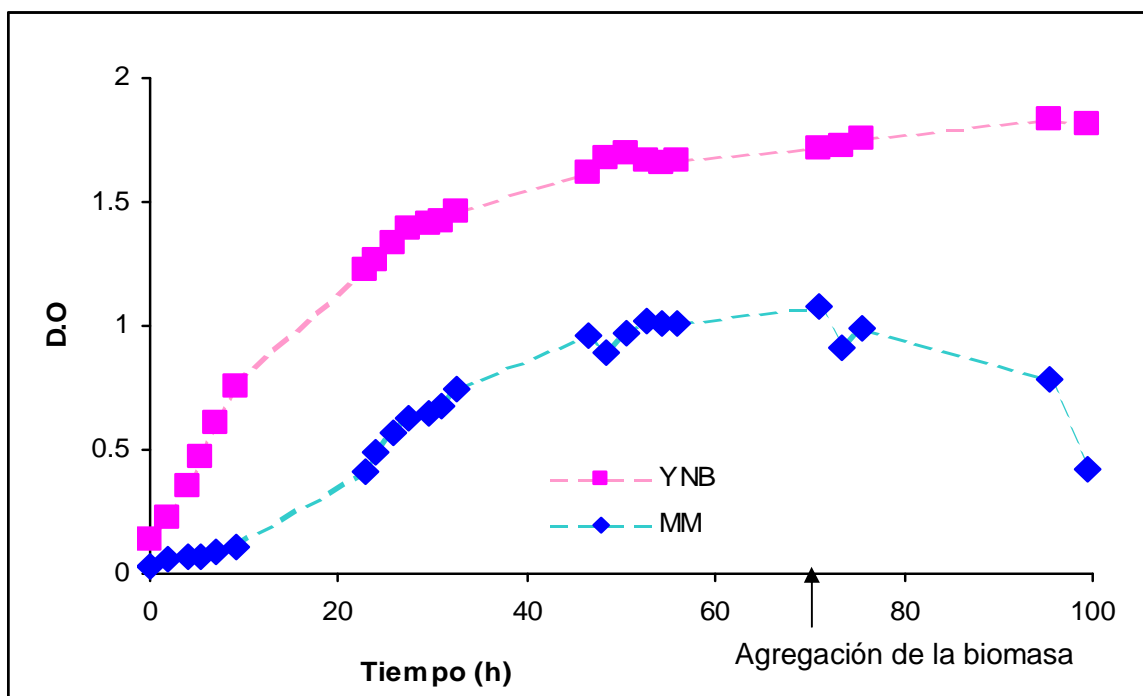


Fig. 4.5. Efecto del medio mineral en el crecimiento de *P. methanolica* PMAD11 (metanol inicial: 369 mmol/L)

A partir de los datos de D.O se calculó una velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). En medio YNB  $\mu_{\text{máx}}$  fue de  $0.079 \text{ h}^{-1}$  y en medio MM de  $0.054 \text{ h}^{-1}$ . Por lo tanto, a partir de este momento, se determinó emplear el medio YNB como medio mineral.

Al tiempo final, la biomasa (evaluada por peso seco) fue  $0.87 \text{ g/L}$  en YNB y  $0.57 \text{ g/L}$  en MM, es decir, la producción de biomasa en YNB fue 54% mayor que en MM. Comparando los dos medios minerales se observa que el medio YNB es 66% más rico en nitrógeno que el medio MM lo que explica la mayor generación de biomasa.

No se cuenta con reportes de la velocidad específica de crecimiento de *P. methanolica*. Sin embargo, la  $\mu_{\text{máx}}$  obtenida es comparable con la  $\mu_{\text{máx}}$  de *Pichia pastoris* (una levadura también metilotrófica crecida en lote con una concentración de metanol de  $65.6 \text{ mmol/L} = 2.1 \text{ g/L}$ ) de la cual se reporta un valor de  $0.0709 \text{ h}^{-1}$  (Zhang *et. al.*, 2000)

#### 4.3 EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE METANOL EN EL CONSUMO DE OXIGENO.

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración inicial de metanol sobre su consumo así como determinar las concentraciones inhibitorias para *P. methanolica*, se realizaron experimentos de oximetría (ver sección 3.5.1 y anexo 7.1).

El efecto de la concentración inicial de metanol se evaluó, de manera indirecta, determinando el consumo de oxígeno por el microorganismo, suponiendo que el consumo de oxígeno es un indicador del consumo de metanol y, considerando la siguiente relación estequiométrica de oxidación completa del metanol:



En la fig 4.6, a modo de ejemplo, se presenta un gráfico de consumo de oxígeno a una concentración de  $129 \text{ mmol/L}$  ( $4.1 \text{ g/L}$ ) de metanol (para mayor detalle de la técnica y el manejo de los datos ver anexo 7.1). Para cada concentración de metanol probada se

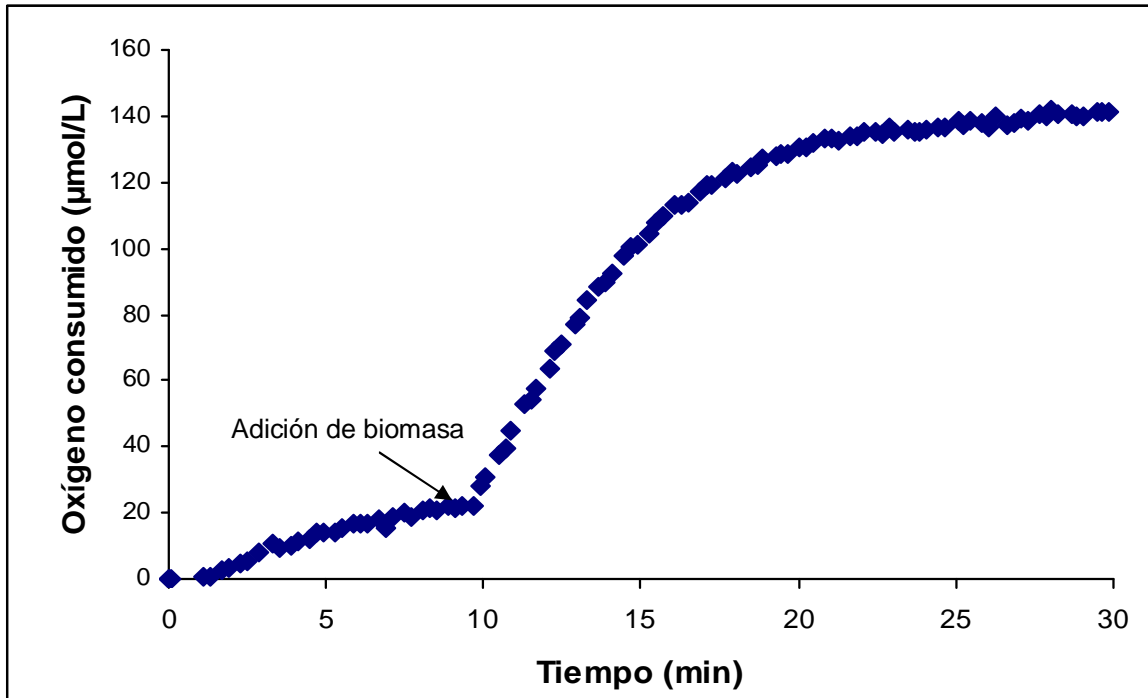


Fig. 4.6 Consumo de oxígeno por *P. methanolica* (metanol: 129 mmol/L= 4.1 g/L, pH 3.5).

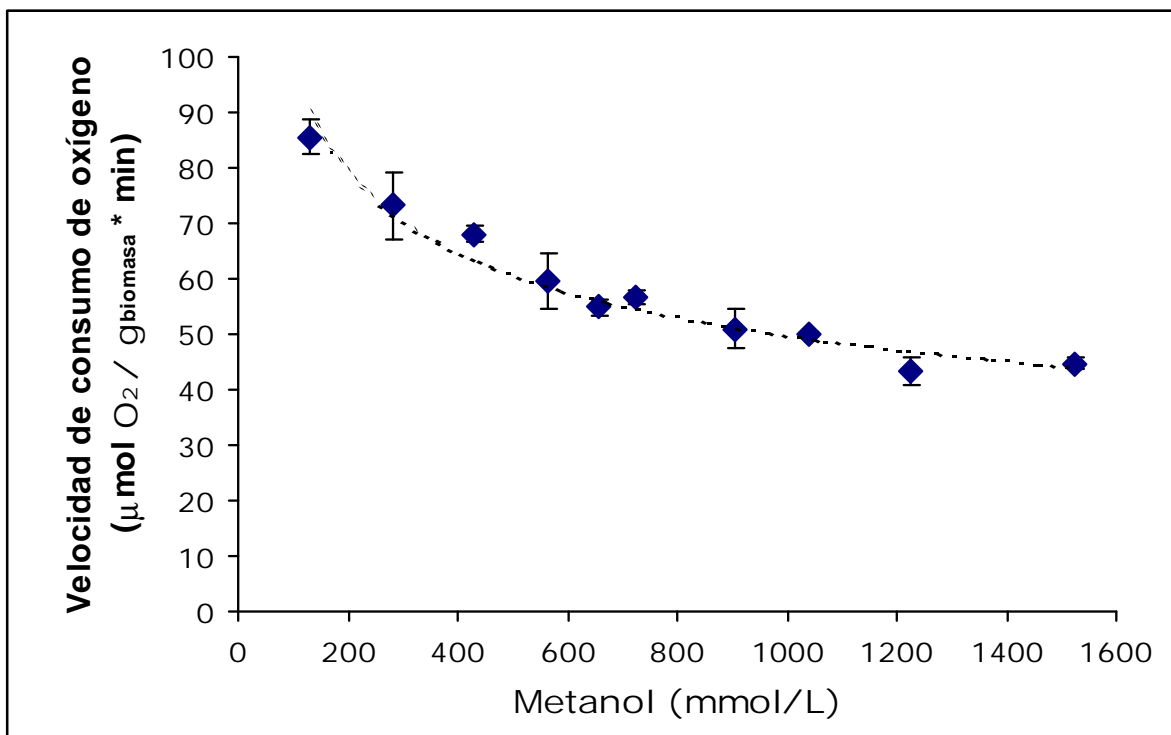


Fig. 4.7 Efecto de la concentración de metanol en el consumo de oxígeno (pH 3.5).

observaron perfiles similares y los datos obtenidos se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (anexo 7.2).

Se calcularon las velocidades máximas de consumo de oxígeno a varias concentraciones de metanol (entre 129 y 1526 mmol/L ). Ver figura 4.7.

Como puede observarse, cuando la concentración de metanol es de 129 mmol/L (concentración mínima evaluada) se obtiene la velocidad máxima de consumo de oxígeno. Asumiendo que el consumo de oxígeno está directamente relacionado al consumo de metanol (ec. 4.1), a 129 mmol/L de metanol se obtiene la mayor velocidad de consumo de este sustrato. Sin embargo, es posible que a concentraciones de menores a 129 mmol/L se obtengan velocidades de consumo de oxígeno mayores hasta alcanzar un punto crítico y que, a concentraciones menores a este valor la velocidad de consumo disminuya debido a una limitación de sustrato. Por otro lado, a medida que se incrementa la concentración de metanol, la velocidad de consumo de oxígeno disminuye, pero no llega a ser nula. Así, a concentraciones de metanol entre 900 - 1526 mmol/L (28.8 – 48.8 g/L), no se observa una variación significativa en la velocidad de consumo de oxígeno siendo esta en promedio de  $50 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ .

Adicionalmente, los datos experimentales se ajustaron a un modelo de inhibición por sustrato (ec 4.2) (Bailey y Ollis, 1986):

$$v = \frac{V_{\text{máx}}}{1 + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_I}} \quad (\text{ec 4.2})$$

donde  $V_{\text{máx}}$ : velocidad máxima de consumo de oxígeno ( $\mu\text{mol O}_2 / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{min}$ )

S: concentración de metanol (mmol/L)

$K_I$ : constante de inhibición (mmol/L)

$K_S$ : constante de disociación (mmol/L)

suponiendo que  $S \gg K_S$ , invirtiendo y reordenando la ec 4.2 se obtiene

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + S \frac{1}{K_I \cdot V_{\text{máx}}} \quad (\text{ec. 4.3})$$

con ordenada al origen  $1/V_{\text{máx}}$  y pendiente  $1/K_I \cdot V_{\text{máx}}$ . Al grafica  $1/v$  vs  $S$  se obtiene (Fig. 4.8):

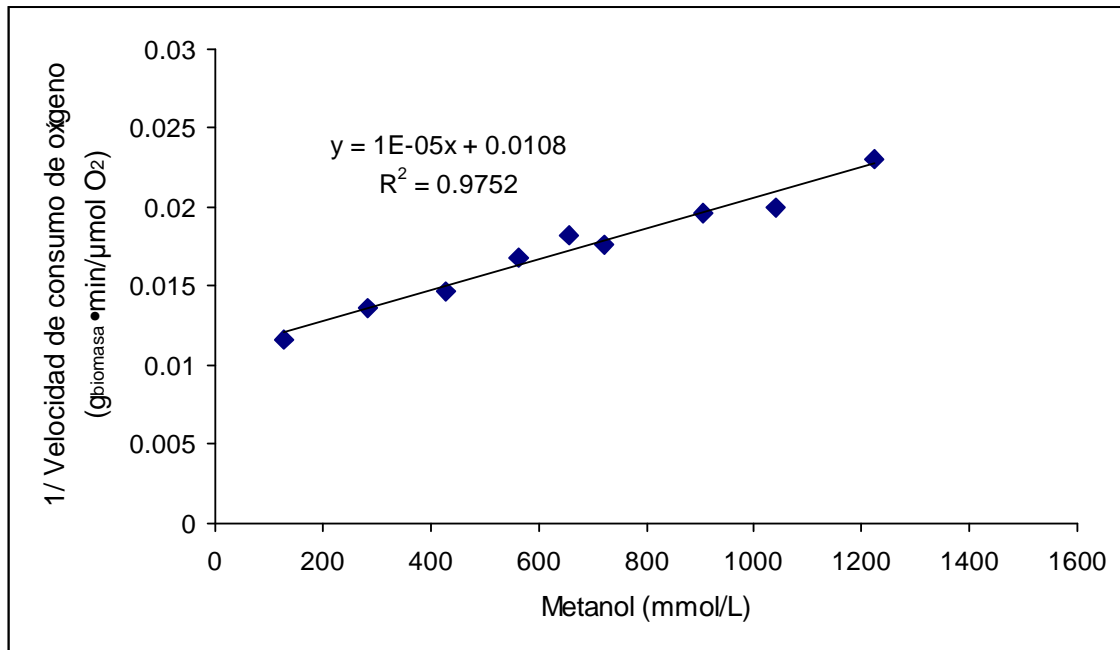


Fig. 4.8. Datos del efecto de la concentración de metanol en el consumo de oxígeno ajustados a un modelo de inhibición por sustrato.

Basándose en la ec. 4.3 y el ajuste de la figura 4.8 se obtiene que  $K_I = 1079.9$  mmol/L (34.6 g/L) lo cual indica que a esta concentración de metanol  $v = 1/2 V_{\text{máx}}$ .

Es posible que no se observe un efecto inhibitorio en el consumo de  $O_2$  a altas concentraciones de metanol debido a que se consume metanol para el mantenimiento de la levadura. Otra posibilidad es que se este oxidando algún otro sustrato como por ejemplo el glucógeno, el carbohidrato de reserva de las levaduras con el mismo fin (Rose y Harrison, 1974). Pero, como se demuestra más tarde (sección 4.5.3 coeficiente de respiración endógena), la presencia de moléculas de reserva en *P. methanolica* es limitada descartando tal posibilidad. Aunque es posible que haya un consumo de oxígeno debido a la oxidación química del metanol, experimentalmente se estableció



---

una metodología para que el metanol no interfiriera en la cuantificación del consumo de oxígeno por *P. methanolica* durante los experimentos (anexo 7.1).

El resultado a altas concentraciones de metanol es sorprendente porque en la literatura se reportan, como concentraciones típicas para el cultivo de *Pichia*, valores entre 100 a 492 mmol/L (3.2 a 15.7 g/L) (Hoop *et. al.*, 1991, Klaus 1996, d'Anjou y Daugulis, 1997, Mayson *et. al.* 2003, Trinh *et. al.*, 2003). Entre las referencias del cultivo de *Pichia* a altas concentraciones se encuentra el trabajo de Duff y Murray (1988) quienes realizaron fermentaciones en lote con concentraciones de metanol que variaron desde 312.5 hasta 1562.5 mmol/L (10 - 50 g/L) para probar el efecto de la concentración de metanol en el crecimiento y en la actividad de la enzima alcohol oxidasa de *P. pastoris*. Como resultado la levadura fue capaz de metabolizar completamente el metanol solamente cuando la concentración fue de 312.5 y 625 mmol/L (10 y 20 g/L). En concentraciones mayores (937.5-1562.5 mmol/L = 30–50 g/L), la levadura sólo fue capaz de metabolizar entre el 76 al 68% del metanol inicial. Respecto a la actividad de la enzima alcohol oxidasa (AO) se observó una reducción (hasta del 36%) en su actividad conforme la concentración de metanol se incrementaba. Por su parte, Zhang *et. al.* (2000) evaluaron la velocidad específica de crecimiento de *P. pastoris* en concentraciones de metanol entre 62.5 a 937.5 mmol/L (2 a 30 g/L) encontrando que la velocidad de crecimiento máximo se alcanza cuando la concentración de metanol es de 114.06 mmol/L (3.6 g/L) (concentración crítica), es decir, a concentraciones superiores se observó una disminución en la velocidad de crecimiento de la levadura, sin que esta llegase a ser nula.

Los resultados experimentales junto con lo reportado en la literatura, indican que, a concentraciones de metanol bajas (129 mmol/L e incluso menores), la velocidad de consumo de oxígeno es máxima debido a una alta actividad de la enzima AO (Duff y Murray, 1988) lo que se ve reflejado en máximas velocidades de crecimiento (Zhang *et.*

al. 2000). A concentraciones superiores (300 - 900 mmol/L) se presenta una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno que podría deberse a una disminución en la actividad de la AO (Duff y Murray, 1988). Cuando la concentración de metanol es mayor a 900 mmol/L, la velocidad de consumo de oxígeno es casi constante, debido tal vez, a que la actividad de la enzima AO es afectada, aunque no inhibida, por la concentración de metanol (Duff y Murray, 1988). También, es posible que a altas concentraciones de metanol, sólo se consuma el sustrato (metanol o glucógeno) necesario para mantener la estructura celular y hacer frente al gradiente de concentraciones presente (energía de mantenimiento). Finalmente, es importante remarcar que *P. methanolica* es un microorganismo capaz de soportar un amplio rango de concentraciones de metanol.

Recordando que el objetivo es trabajar en un sistema de biofiltración y que, en un biofiltro es difícil mantener condiciones de esterilidad (sobre todo a gran escala), uno de los métodos para limitar la presencia de microorganismos contaminantes es trabajar en concentraciones de metanol lo suficientemente altas para inhibir la contaminación bacteriana. Un intervalo tentativo de concentraciones podría ser, con base en los resultados de Zhang *et. al* (2000) y los presentados en el gráfico 4.7, de entre 100 a 400 mmol/L (3.2 a 12.8 g/L).

#### **4.4 EFECTO DEL pH EN EL CONSUMO DE OXIGENO EN MEDIO LIQUIDO.**

Mediante experimentos de oximetría se evaluó el efecto del pH en la velocidad de consumo de oxígeno por parte de *P. methanolica* como medida indirecta del consumo de metanol (sección 3.5.2), basándose en la estequiometría presentada en la ec. 4.1.

Se obtuvieron perfiles de consumo de oxígeno análogos al presentado en la figura 4.6 y se calculó la velocidad máxima de consumo de oxígeno a cada pH, aplicando el modelo de Gompertz (anexo 7.2, fig 4.9).

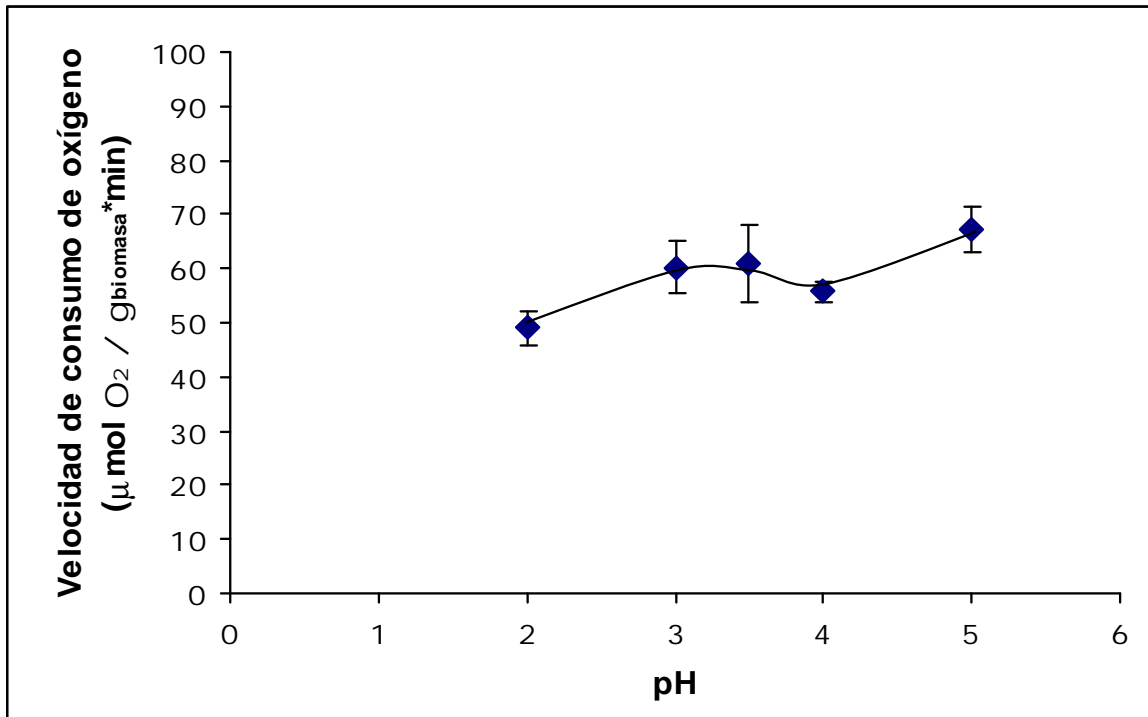


Fig. 4.9 Efecto del pH en el consumo de oxígeno. ([metanol]: 369 mmol/L = 11.8 g/L)

Puesto que el pH no tiene un efecto significativo sobre el consumo de metanol, trabajar a pH's bajos puede ser una buena estrategia para limitar la presencia de contaminación bacteriana ya que estos microorganismos crecen a pH's de 5-8 en tanto que *Pichia* crece a pH's entre 3 a 6.5 (Klaus 1996).

#### 4.5 OBTENCION DE PARAMETROS CINETICOS DE CONSUMO DE METANOL Y RENDIMIENTO $Y_{X/S}$ .

La velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) es un parámetro independiente de la concentración de células que describe la efectividad de las mismas en la utilización de la fuente de carbono y, considerando que cuando la levadura está en fase de crecimiento el sustrato consumido se orienta a la producción de biomasa, está definida por:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \quad (\text{ec. 4.4})$$

donde:

$q_s$ : velocidad específica de consumo de sustrato ( $\text{g}_{\text{metanol}} / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$ )

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )

$Y_{x/s}$ : rendimiento de conversión del sustrato en biomasa ( $\text{g}_{\text{biomasa}} / \text{g}_{\text{metanol}}$ ).

$m$ : coeficiente de mantenimiento ( $\text{g}_{\text{metanol}} / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$ )

La razón de evaluar los parámetros de la ec. 4.4 es:

$q_s$ : es un indicador de la capacidad de *P. methanolica* para consumir el metanol y permite estimar la capacidad de remoción de este contaminante en un sistema de biofiltración,

$Y_{x/s}$ : puesto que dentro de los objetivos se planteó obtener una alta densidad celular, resulta importante el evaluar el coeficiente de conversión de metanol en biomasa y,

$m$ : debido a que en un biofiltro, es común que haya limitación de algún nutriente o incluso de la fuente de carbono.

Adicionalmente se determinó el coeficiente de respiración endógena para evaluar si la levadura cuenta con algún material de reserva que pueda consumir en ausencia de metanol.

#### **4.5.1 VELOCIDAD ESPECIFICA DE CONSUMO DE METANOL ( $q_s$ ) Y RENDIMIENTO $Y_{x/s}$ .**

El parámetro  $q_s$  se evaluó en un ambiente cerrado (microcosmos), con medio mineral YNB y metanol (ver tabla 3.3) siguiendo a lo largo del tiempo la evolución del metanol,  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  (figura 4.10).

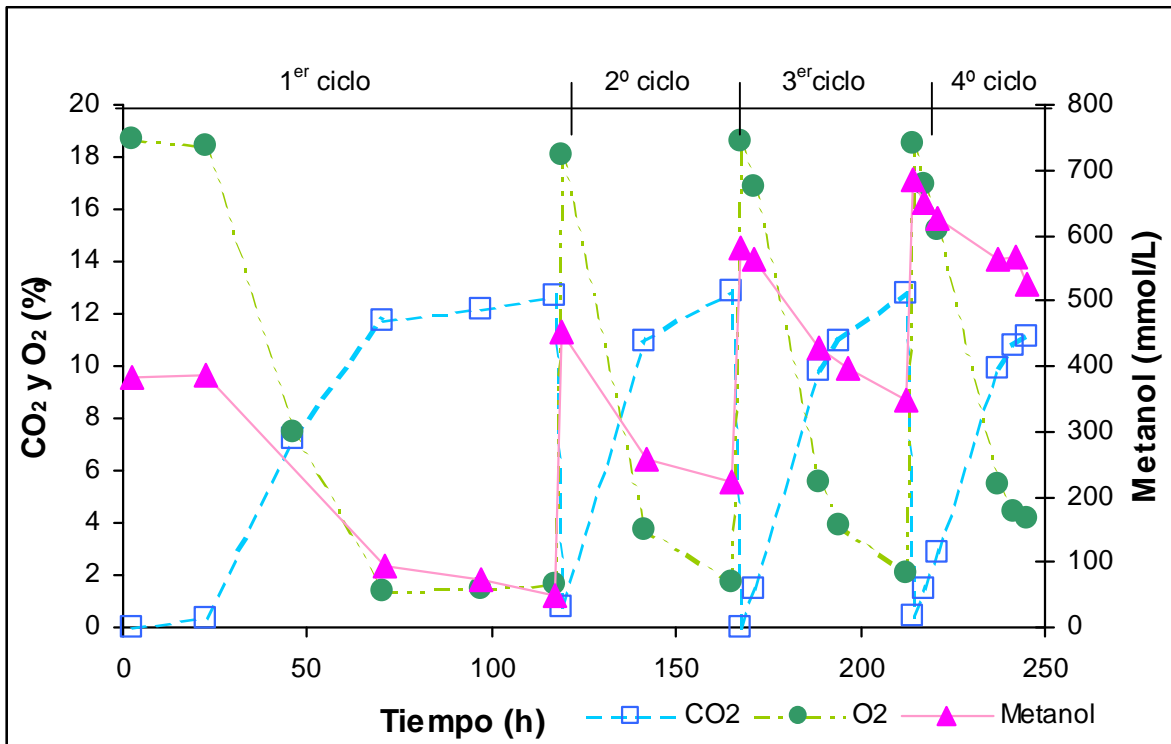


Fig. 4.10. Consumo de  $O_2$ , metanol y producción de  $CO_2$ . Condiciones: YNB + metanol + inóculo.

Se observa que el primer ciclo es el más largo debido a que hay una etapa de adaptación del microorganismo de aproximadamente 20 horas y a que no se hizo la renovación del oxígeno inmediatamente después de observar que su baja concentración limitaba el consumo de metanol en el sistema (71 horas). Sin embargo, para el posterior cálculo de  $q_s$  se emplean, en el primer ciclo, los datos obtenidos hasta las 71 horas.

Una vez restablecidas las condiciones iniciales (ver sección 3.6), en el 2º ciclo se observa que la levadura se adapta rápidamente lo cual se refleja en la velocidad de consumo de metanol. Para el 3º y 4º ciclo, la concentración inicial de metanol fue incrementando hasta alcanzar en el 4º ciclo un valor de 657 mmol/L (21 g/L). Esto se debe a que, al ser el metanol una molécula hidrofílica, una fracción del metanol del ciclo

anterior se quedaba en la fase acuosa y al adicionar metanol al nuevo ciclo, la concentración fue incrementando.

Respecto al comportamiento del CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> en el 2º, 3º y 4º ciclo, se observa que presentaron un comportamiento análogo indicando la reproducibilidad de los mismos.

Los datos experimentales, se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (anexo 7.2) para evaluar la  $q_s$  y se presentan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Velocidad específica de consumo de metanol en cada ciclo evaluado en microcosmos (YNB + metanol + inóculo).

Ciclo	Duración (h)	$q_s$ (g <sub>metanol</sub> /g <sub>biomasa</sub> •h)
Primero	71	0.033
Segundo	48	0.066
Tercero	47	0.058
Cuarto	33	0.036

De los cuatro valores obtenidos, se tomó el máximo, que fue de 0.066 g<sub>metanol</sub> /g<sub>biomasa</sub>•h, como el valor de  $q_s$  ya que en el tercer y cuarto ciclo, el valor de  $q_s$  disminuye significativamente debido, tal vez, al incremento en la concentración de metanol del microcosmo. Este resultado coincide con los obtenidos en el experimento de oximetría (Fig. 4.7) donde se observó que concentraciones de metanol superiores a los 400 mmol/L (12.8 g/L) causan una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno y subsecuentemente de metanol (ec. 4.1).

En la tabla 4.4 se compara el valor de la  $q_s$  obtenida con respecto a lo reportado en la literatura.

Tabla 4.4 Valores de velocidad específica de consumo de metanol.

Microorganismo.	$q_s$ (g <sub>metanol</sub> /g <sub>biomasa</sub> •h)	Referencia
<i>P. pastoris</i>	0.02 – 0.015	D'Anjou y Daugulis, 2000
<i>P. pastoris</i>	0.068	Zhang <i>et. al.</i> , 2000
<i>P. methanolic</i>	0.066	Este trabajo

Los valores de  $q_s$  presentados en la tabla 4.4 varían en un amplio rango, lo cual, puede deberse a la diferencia en las condiciones de cultivo o a las cepas. Sin embargo, resulta interesante que la  $q_s$  obtenida en este trabajo sea similar a la reportada por Zhang *et al.* (2000) para *P. pastoris* cuando la concentración inicial de metanol fue de 66 mmol/L (2.1 g/L), es decir, 6 veces menor a la empleada en este trabajo. Esto manifiesta la capacidad de *P. methanolica* para soportar altas concentraciones de metanol, en comparación con otra cepa metilótrofa como *P. pastoris*.

Bajo las mismas condiciones experimentales en que se evaluó  $q_s$ , se estimó el coeficiente de rendimiento celular ( $Y_{X/S}$ ) el cual es definido como la unidad de biomasa producida por unidad de sustrato consumido. Este coeficiente depende de la estructura de la fuente de carbono así como de las características fisiológicas de los microorganismos consumidores del mismo.

Suponiendo que la biomasa se generó durante el primer ciclo se realizó un balance de carbono entre el metanol consumido, el  $CO_2$  producido y la biomasa presente (3.44 g/L), empleando la fórmula empírica de la composición elemental de una levadura  $C_4H_7N_{0.6}O_2$  (Atkinson y Mavituna 1991). El balance indica que 46.5% del carbono inicial se empleó en la formación de biomasa y 28 % a la producción de  $CO_2$ . También se detectó la presencia de un compuesto intermediario el cual se analizó por cromatografía de gases acoplada a masas sin lograr su identificación. Es posible que se trate de dihidroxiacetona, un compuesto volátil presente en la ruta metabólica de *Pichia*, ya que, analizando la muestra por cromatografía se descartó la posibilidad de que fuera formaldehído o ácido fórmico, dos moléculas que podrían derivar de una oxidación incompleta del metanol.

Así, los datos experimentales permitieron calcular un valor de  $Y_{X/S}$ , el cual se presenta en la tabla 4.5 junto con otros reportados en la literatura.

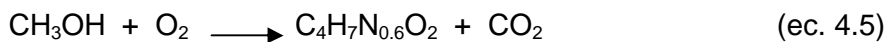
Tabla 4.5 Valores del rendimiento de conversión de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ ).

Microorganismo	$Y_{X/S}$ (g <sub>biomasa</sub> / g <sub>metanol</sub> )	Referencia
<i>P. pastoris</i>	0.18	Duff y Murray, 1988
<i>P. pastoris</i>	0.61 – 1.73	d'Anjou y Daugulis, 2000
<i>P. pastoris</i>	1.19	Zhang <i>et. al</i> , 2000
<i>P. methanolica</i>	0.34	Este trabajo

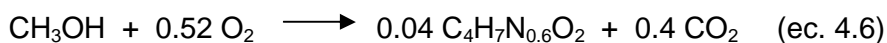
Como se observa, el valor de  $Y_{X/S}$  varía ampliamente lo cual puede deberse a la diferencia en las condiciones de crecimiento y a la especie de la levadura. Así, el valor obtenido en este trabajo se encuentra en el límite inferior de lo reportado.

En este proyecto es muy importante generar biomasa ya que parte del interés es, a futuro, poder producir una proteína heteróloga y, la producción de este tipo de proteínas está directamente relacionada a la cantidad de biomasa. Así, se recomienda el empleo de soluciones concentradas de sales minerales, principalmente macro nutrientes como nitrógeno, para fomentar la generación de biomasa.

Finalmente, considerando que la reacción global de consumo de metanol y  $O_2$  y de generación de  $CO_2$  y biomasa es:



y partiendo del balance global de estos parámetros en el microcosmos (39.9% del carbono inicial se convirtió en  $CO_2$  y 16.1% en biomasa), se intentó estimar los coeficientes de la reacción obteniéndose:



#### 4.5.2 COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO.

Cuando la concentración de la fuente de carbono o de algún nutriente es limitada, el consumo del sustrato ocurrirá sin la generación de nuevas células. En ese caso, la energía generada es empleada únicamente en sostener a las células en un estado



viable manteniendo el gradiente de concentraciones entre el interior y el exterior. El nivel de energía requerida para mantener una célula es llamada energía de mantenimiento (Maier *et. al.*, 2000). Es muy común que en los procesos de biofiltración exista limitación de algún nutriente debido a la falta de adición de estos o a su distribución no homogénea en la columna. Así, es importante determinar el consumo de la fuente de carbono en tales condiciones.

El coeficiente de mantenimiento se determinó en medio líquido y en ausencia de sales minerales. La producción de  $\text{CO}_2$  así como el consumo de  $\text{O}_2$  y metanol bajo estas condiciones se presentan en la figura 4.11 donde se observa que los tres parámetros tuvieron un perfil lineal durante las 250 horas del experimento.

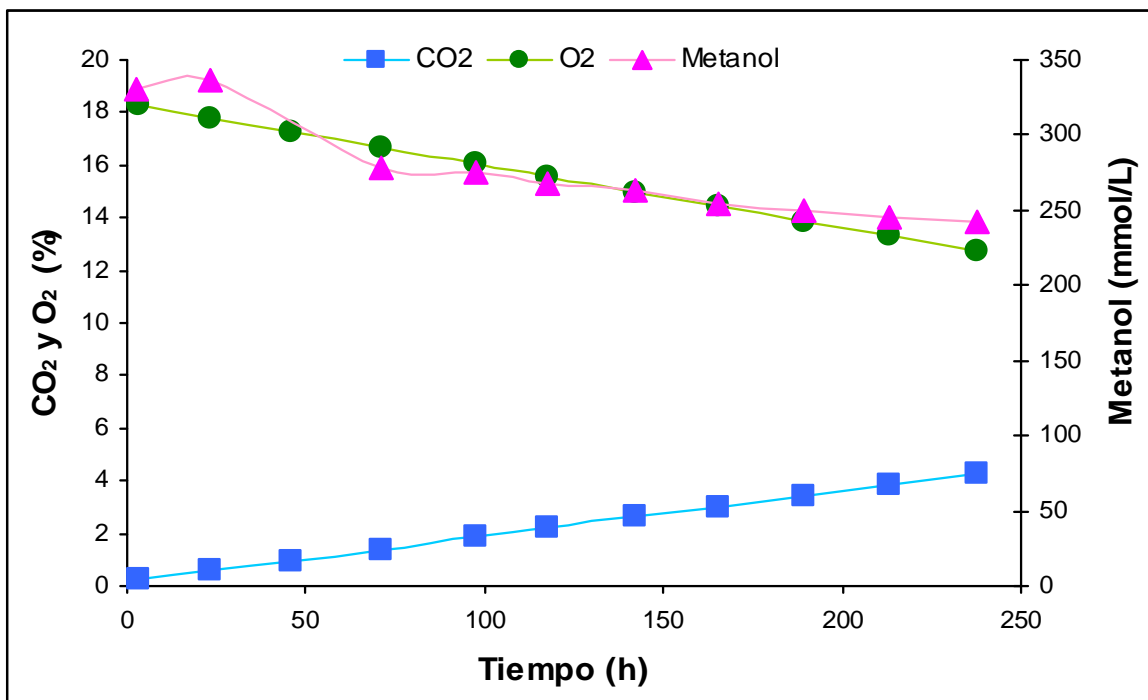


Fig. 4.11 Perfil de metanol,  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . Condiciones:  $\text{NaCl}$  9 g/L + metanol + inóculo

El valor del coeficiente de mantenimiento obtenido junto con algunos reportados en la literatura se presentan en la tabla 4.6. En ella se observa que el valor obtenido en este trabajo, se encuentra en el límite inferior de lo reportado en la bibliografía. Sin embargo,

comparando el coeficiente de mantenimiento ( $m$ ) y la velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ) de este trabajo se observa que el primero representa el 36.1% del segundo (para el caso de Zhang *et. al.* 2000 representa entre el 10.4 al 45.45%).

Tabla 4.6 Valores del coeficiente de mantenimiento ( $m$ ) determinados en medio líquido.

Microorganismo	$m$ ( $\text{mg}_{\text{metanol}} / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$ )	Metanol		Referencia
		( $\text{mmol/L}$ )	( $\text{g/L}$ )	
<i>P. pastoris</i>	25.4	114	3.7	Zhang <i>et. al</i> 2000
<i>P. pastoris</i>	114.3	906	29	Zhang <i>et. al</i> 2000
<i>P. methanolica</i>	23.8	369	12	Este trabajo

El hecho de que el coeficiente de mantenimiento obtenido sea alto resulta interesante para un proceso de biofiltración. La razón es que inicialmente el metanol consumido se emplea en la generación de biomasa estando la velocidad de consumo de metanol definida por  $q_s$ . Sin embargo, una vez que se han agotado las sales minerales, se espera que la levadura continúe consumiendo metanol generando  $\text{CO}_2$  (fase de mantenimiento). Así, es importante que el consumo de metanol no disminuya drásticamente en estas condiciones.

Substituyendo en la ec. 4.4 los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  (sección 4.2.2),  $Y_{X/S}$  (sección 4.5.1) y  $m$  (sección 4.5.2) obtenidos experimentalmente, se obtiene un valor de  $q_{S\text{máx}}$  el cual es de  $0.256 \text{ g}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$ . Este valor es casi 4 veces mayor que el obtenido experimentalmente ( $0.066 \text{ g}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$ ). La discrepancia entre ambos valores posiblemente se debe a que  $\mu_{\text{máx}}$  se evaluó en diferentes condiciones experimentales a las de  $Y_{X/S}$  y  $m$ . Además, el valor de  $q_{S\text{máx}}$  sería válido si el metanol consumido se hubiera empleado sólo en la generación de biomasa. Considerando que además de biomasa se produjo  $\text{CO}_2$  se toma el valor de  $q_s$ :  $0.066 \text{ g}_{\text{metanol}} / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$  como el más confiable.

### 4.5.3 COEFICIENTE DE RESPIRACIÓN ENDOGENA.

Cuando la fuente de carbono o un nutriente esencial se ha agotado completamente, la respiración no se detiene ya que los microorganismos pueden emplear sus materiales celulares de reserva (por ejemplo glucógeno) o los nutrientes de las células que están muriendo para este fin. Esto se conoce como respiración endógena. Aunque el metabolismo endógeno ocurre durante todo el ciclo de crecimiento, puede ser observado mejor durante la fase estacionaria y ser medido en términos del consumo de oxígeno o la generación de bióxido de carbono (Maier *et. al.*, 2000).

El consumo de  $O_2$  así como la producción de  $CO_2$  en el metabolismo endógeno en medio líquido se presenta en la figura 4.12.

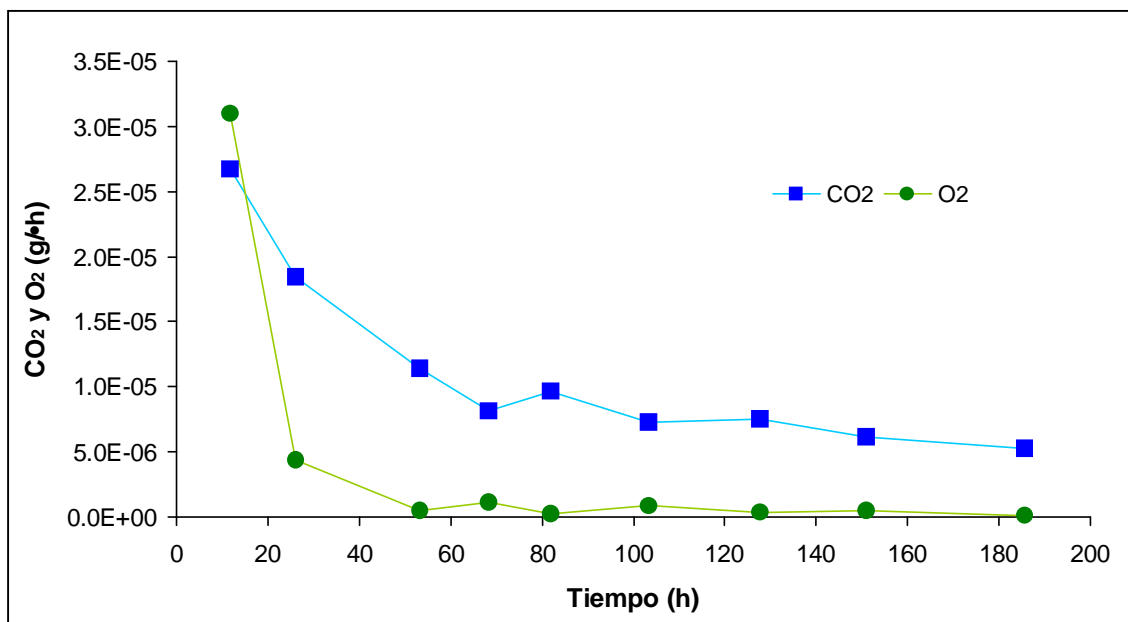


Fig. 4.12 Perfil de consumo de  $O_2$  y producción de  $CO_2$ . Condiciones: YNB + inóculo.

La velocidad global de producción de  $CO_2$  en ausencia de metanol fue de  $0.0013 \text{ g } CO_2 / \text{ g biomasa} \cdot \text{h}$  lo que indica que en la levadura la presencia de material de reserva es limitada.

## 4.6 EXPERIMENTOS DE BIOFILTRACION.

A continuación se presentan los resultados de la biofiltración del metanol con un cultivo puro de *P. methanolica*.

### 4.6.1 CARACTERIZACION DE LOS SOPORTES.

Como se describió en la sección 1.3.1.1, la elección del soporte es fundamental en el proceso de biofiltración. Así, para la selección de los materiales se consideró:

- Las propiedades físicas de retención de agua, área superficial, densidad e integridad estructural.
- Reportes previos de soportes empleados en biofiltración, en particular con cultivos puros.
- Disponibilidad y costo.

En la tabla 4.7 se presentan las características, recopiladas de la literatura, de los soportes elegidos: perlita y bagazo de caña.

Tabla 4.7 Características de perlita y bagazo de caña.

Característica	Perlita	Bagazo de caña
Capacidad de retención de agua (%)	Alta <sup>(d)</sup>	63 <sup>(a)</sup>
Area superficial	Alta <sup>(c, d)</sup>	nd
$\rho$ soporte húmedo (g/mL)	0.08 - 0.32 <sup>(b)</sup>	0.25 <sup>(a)</sup>
Requerimientos	Adición de nutrientes <sup>(c)</sup>	Adición de nutrientes <sup>(a)</sup>
Costo	Bajo <sup>(c)</sup>	Ninguno
Trabajos previos	Shareefdeen <i>et.al</i> (1993) Mohseni y Grant, (1999)	Christen <i>et. al.</i> (2002)

<sup>(a)</sup> Christen *et. al.* 2002 <sup>(b)</sup> www.perlite.info, 2002. <sup>(c)</sup> Devinny *et. al* 1999 <sup>(d)</sup> Shareefdeen *et.al* 1993. nd: no disponible.

Se caracterizaron los soportes de acuerdo a la metodología presentada en el apartado 3.7.1. Los resultados se presentan en la tabla 4.8

Tabla 4.8 Caracterización de los soportes.

	Perlita	Bagazo de caña
Tamaño partícula (mm)	2.36-4.76	1.00-4.76
$\rho$ aparente (g/mL)	0.104	0.088
$\rho$ soporte húmedo (g/mL)	0.319	0.265
CRA (%)	67.2	66.7

Los resultados de la caracterización de los soportes corroboran que se trata de materiales con una baja densidad y que tienen una alta capacidad de retención de agua (CRA). Normalmente los soportes usados en biofiltración tienen capacidades de retención de agua entre 40 – 80%.

#### **4.6.2 INFLUENCIA DE LA CARGA SOBRE LA EFICIENCIA DE REMOCION.**

Puesto que la carga de metanol es un parámetro que se puede modificar mediante la concentración del contaminante y del flujo de alimentación, se estudió la influencia de estos dos parámetros en el proceso de biofiltración.

##### **4.6.2.1 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE METANOL.**

En la sección 4.3 se determinó que concentraciones de metanol en fase líquida entre 100 – 400 mmol/L (3.2 – 12.8 g/L) son las que favorecen su consumo. Empleando la isoterma de adsorción del metanol en el sistema bagazo + medio YNB/ metanol (sección 4.1) se determinó que estas concentraciones equivalen, en fase gas, a 2.84 – 11.07 g/m<sup>3</sup>. Se evaluaron concentraciones crecientes de metanol dentro de este intervalo para determinar si un comportamiento similar al de medio líquido se presenta en biofiltración.

A lo largo de todo el experimento, realizado con bagazo de caña como soporte, el flujo de alimentación fue de  $4.8 \times 10^{-3}$  m<sup>3</sup>/h, así que el tiempo de residencia del metanol

gaseoso en el reactor fue de 2.5 minutos. La concentración de metanol inicial fue de 3.5 g/m<sup>3</sup> incrementándose según se muestra en la figura 4.13.

Las condiciones iniciales fueron: pH, 5.4; biomasa, 0.19 mg /g<sub>soporte seco</sub> y humedad relativa, 66.4%.

En las figuras 4.13 y 4.14 se muestran la evolución de la carga y de la eficiencia de remoción (ER) así como de la capacidad de eliminación (CE) y la producción de CO<sub>2</sub> durante las 309 horas del proceso.

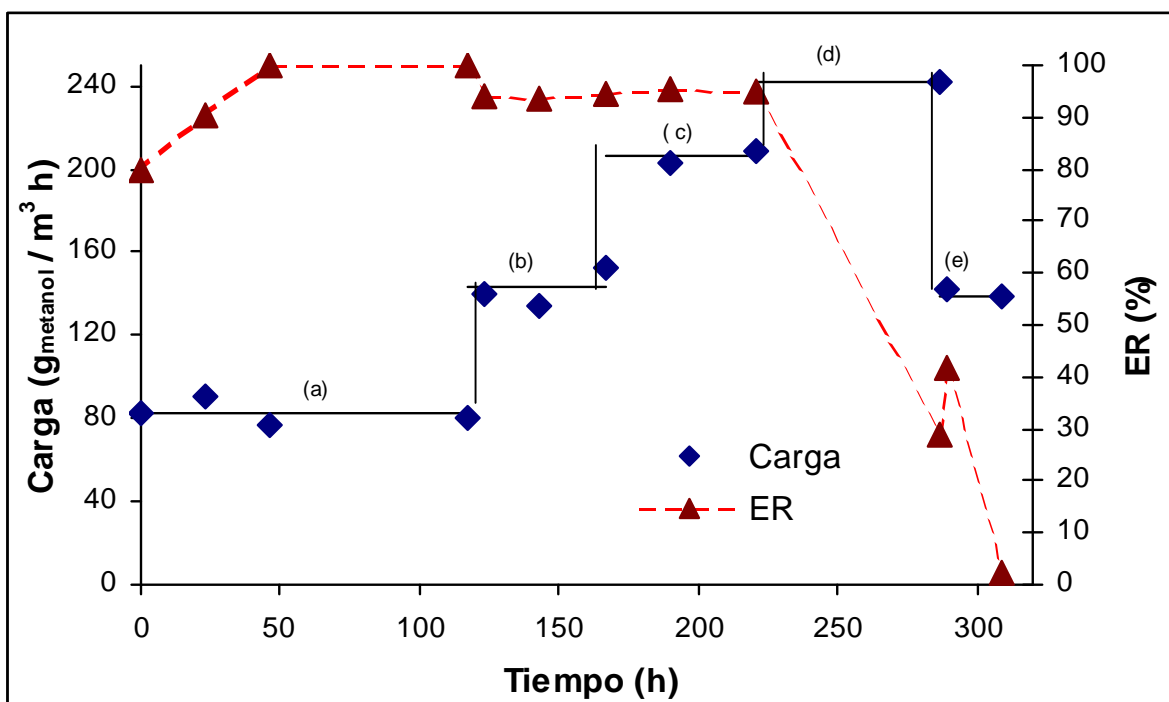


Fig. 4.13. Comportamiento de la carga y de la eficiencia de remoción en función de la concentración de metanol en un biofiltro con bagazo de caña como soporte. Etapas: (a): 3.5 g/m<sup>3</sup>; (b): 6 g/m<sup>3</sup>; (c): 8.7 g/m<sup>3</sup>; (d): 10 g/m<sup>3</sup>; (e): 5.8 g/m<sup>3</sup>.

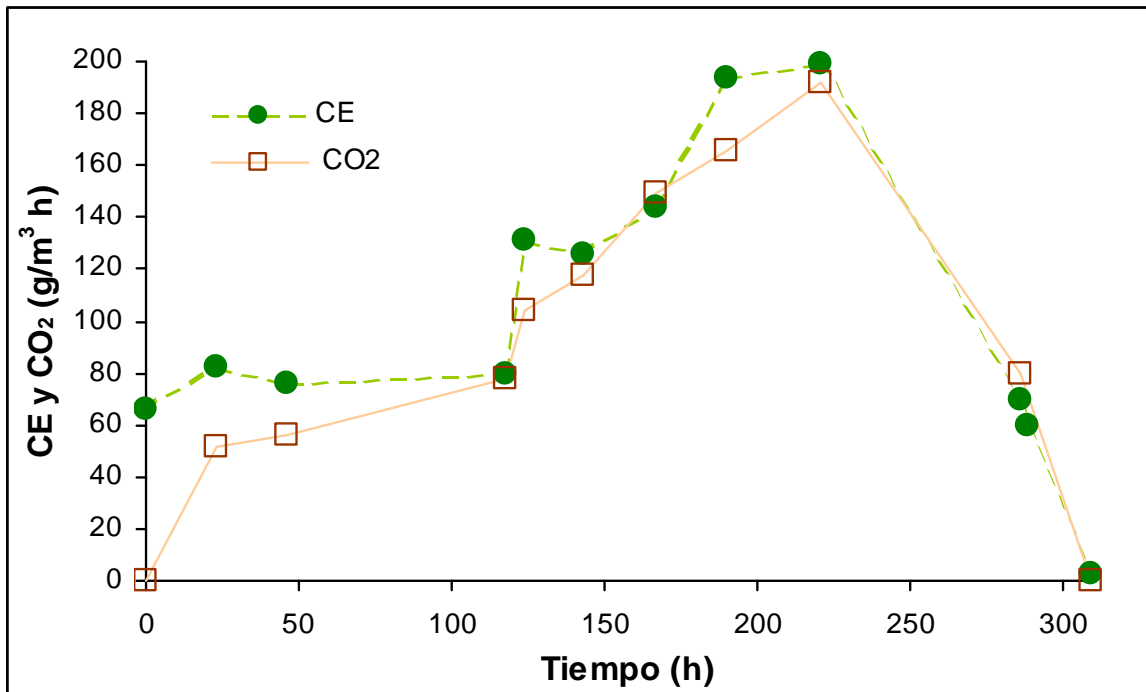


Fig. 4.14. Comportamiento de la capacidad de eliminación y de la producción de CO<sub>2</sub> en función de la concentración de metanol de un biofiltro empacado con bagazo de caña como soporte.

Durante las primeras 120 horas, la concentración de metanol se mantuvo en 3.5 g/m<sup>3</sup>, lo que correspondió a una carga promedio de 82 g/m<sup>3</sup>·h (figura 4.13).

La ER el primer día fue del 80%, talvez debido a que parte del metanol alimentado se adsorbió en el soporte, a un proceso de adaptación de la levadura o a que no había suficiente biomasa para eliminar todo el metanol alimentado. Después de 46 horas la ER en la columna fue del 100%. Además, la producción de CO<sub>2</sub> al inicio fue nula (lo que apoya la hipótesis de adsorción de metanol en el soporte) y posteriormente fue incrementando hasta alcanzar un valor de 52 g/m<sup>3</sup>·h a las 24 hrs. (fig. 4.14).

Puesto que a una carga de 82 g/m<sup>3</sup>·h se obtuvo el 100% de ER, se procedió a incrementarla. Así, en la etapa (b) y (c) se alcanzaron ER entre 93 – 95% con cargas de 140 y 205 g/m<sup>3</sup>·h respectivamente. Cada etapa tuvo una duración de 48 horas.

Cuando la concentración de metanol se incrementó a 10 g/m<sup>3</sup> (carga de 240 g/m<sup>3</sup>·h por un periodo de 60 horas), se observó una caída rápida de la ER hasta 29 %. En un

intento por recuperar la eficiencia del biofiltro, se disminuyó la concentración de metanol a  $5.8 \text{ g/m}^3$  ( $140 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ ) sin embargo no se logró restablecer el sistema. Parece ser que el metanol a una concentración de  $10 \text{ g/m}^3$  causó intoxicación a la levadura.

Como se observa en la gráfica 4.14 se obtuvo una CE máxima promedio de  $196 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$  durante 48 horas. En el mismo gráfico se muestra que el consumo de metanol y la producción de  $\text{CO}_2$  estuvieron estrechamente relacionados obteniéndose valores de  $\text{CO}_2$  de  $192 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$  al tiempo de máxima eliminación.

El análisis de una muestra al final del proceso indica que las condiciones en la columna eran: pH: 2.7, biomasa:  $2.49 \text{ mg/g}_{\text{soporte seco}}$  y, humedad relativa: 66.0%

El balance de carbono se presenta en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Balance de carbono al tiempo final.

Sustrato	Productos	
	$\text{CO}_2$ (g C) (% del C consumido)	Biomasa (g C) (% del C consumido)
Metanol consumido (g C)	1.68 (64%)	0.02 (1%)
2.63		

Se considera la composición elemental de la levadura:  $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_{0.6}\text{O}_2$  (Atkinson y Mavituna 1991).

El 65% del carbono alimentado se convirtió en  $\text{CO}_2$  o biomasa. No se detectó, mediante cromatografía, la presencia de algún compuesto intermediario volátil que permita justificar el 35% de carbono restante. Sin embargo, el pH de 2.7 al final del proceso es un indicador de la producción de un intermediario ácido, probablemente el ácido fórmico, resultado de la oxidación incompleta del metanol. Otra razón es que parte del metanol alimentado se haya quedado adsorbido en el soporte del reactor.

Las concentraciones de metanol que *P. methanolica* puede soportar en el biofiltro son similares a las reportadas en trabajos previos de biofiltración con diferentes consorcios microbianos en los que se han empleado concentraciones de 2 a  $8.7 \text{ g/m}^3$  (Shareefdeen



*et. al.* 1993; Thalasso *et. al.* 1999; Krailas *et. al.* 2000; Mohseni y Grant, 2000; Kong *et. al.* 2001; Krailas *et. al.* 2002). Por su parte, Cornabé *et. al.* (2002) reportan el empleo de concentraciones de metanol de hasta  $6 \text{ g/m}^3$  en un biofiltro inoculado con *P. pastoris*.

Los resultados indican que concentraciones de hasta  $8.7 \text{ g/m}^3$  (lo que equivale a  $314 \text{ mmol/L} = 10 \text{ g/L}$  de metanol en el sistema líquido + soporte según la isoterma de adsorción) no inhiben el metabolismo de *P. methanolica*. Sin embargo, una concentración de  $10 \text{ g/m}^3$  (equivalente a  $364 \text{ mmol/L} = 11.7 \text{ g/L}$  en el sistema líquido + soporte) resulta claramente tóxica para la levadura.

No se exploraron concentraciones entre  $8.7$  y  $10 \text{ g/m}^3$  que permitieran establecer el valor de la concentración crítica a la cual se manifiesta el efecto tóxico del metanol, pero de manera práctica, resulta importante no emplear concentraciones superiores a  $8.7 \text{ g/m}^3$  la cual es, sin embargo, una concentración alta para un proceso de biofiltración.

#### **4.6.2.2 INFLUENCIA DEL FLUJO DE ALIMENTACION.**

Para evaluar la influencia del flujo de alimentación se emplearon columnas con un volumen útil de  $0.2 \text{ L}$  empacadas con bagazo de caña. El estudio se realizó manteniendo constante la concentración de metanol la cual fue de  $3.6 \pm 0.39 \text{ g/m}^3$ . Se probaron flujos de alimentación de  $4.8 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-3}$ ,  $7.2 \times 10^{-3}$  y  $9 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$  lo que corresponde a tiempos de residencia de 150, 120, 100 y 80 segundos respectivamente. Así, la carga inicial fue de  $80 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$

Las condiciones iniciales de pH, humedad y biomasa se presentan en la tabla 4.10 y el comportamiento de la carga, ER, CE y  $\text{CO}_2$  se presentan en las figuras 4.15 y 4.16.

Durante las primera 190 horas (flujos de  $4.8 \times 10^{-3}$  y  $7.2 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ ) la ER se mantuvo en 100% (carga promedio de 80 y  $120 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$  respectivamente). Sin embargo, cuando se modificó el flujo a  $9 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$  (carga de  $150 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ ) la ER cayó al 49%. Para recuperar la eficiencia del biofiltro se disminuyó el flujo a  $7.2 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$  ( carga  $120 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ ) y

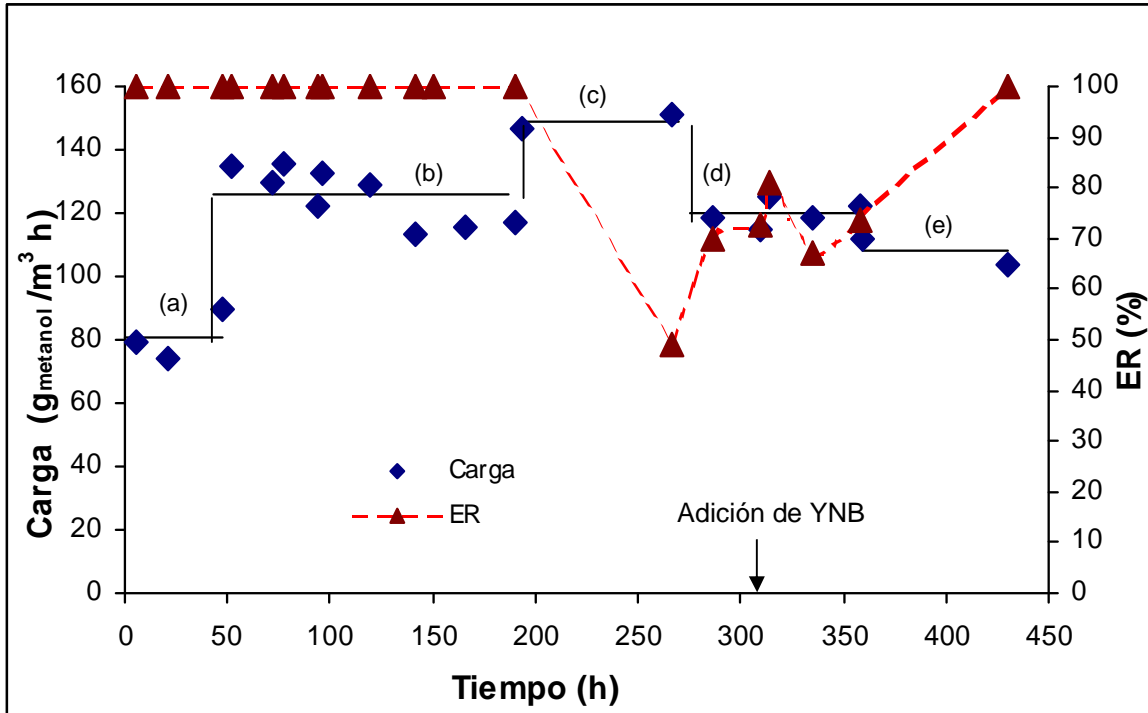


Fig. 4.15 Efecto del flujo de alimentación en el comportamiento de la carga y en la eficiencia de remoción de un biofiltro empacado con bagazo de caña. Etapas: (a):  $4.8 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ , (b) y (d):  $7.2 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ , (c):  $9 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$  y (e):  $6 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ .

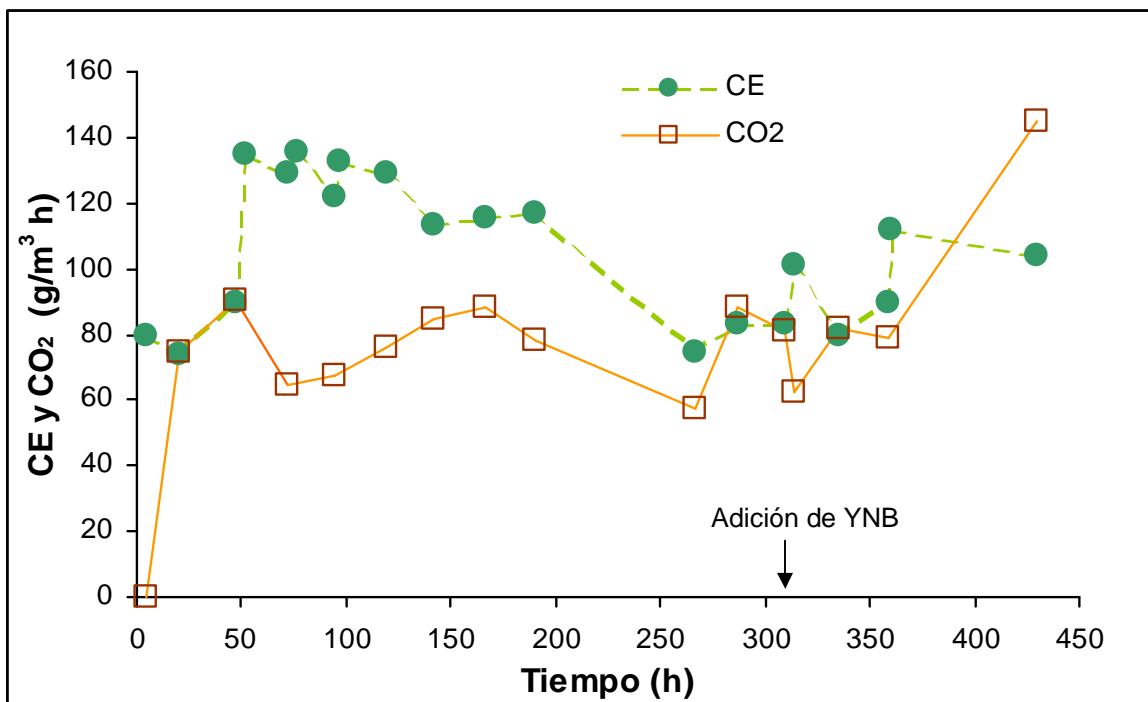


Fig. 4.16. Efecto del flujo de alimentación en la capacidad de eliminación y la producción de CO<sub>2</sub>.

Tabla 4.10 Condiciones de pH, humedad y biomasa en un biofiltro con bagazo de caña .

	t: 0 hrs	t: 307 hrs	t: 430 hrs
<b>pH</b>	4.7	2.7	2.7
<b>Humedad relativa (%)</b>	65.8	53 <sup>(a)</sup>	70.9
<b>Biomasa (mg /g<sub>soporte seco</sub>)</b>	0.92	20.5	17.9

<sup>(a)</sup> Después de adicionar 10 mL de YNB, la humedad del sistema fue 70%

después de 48 horas la ER era del 73%. Con el fin de conocer las condiciones de la columna en ese momento (307 horas), se tomó una muestra homogénea del soporte. Se determinó que la humedad del sistema era del 53%, lo que puede explicar la baja ER, por lo que se adicionaron 10 mL de YNB (33.5 g/L) a las 312 horas. Después de 48 horas, la ER no había mejorado.

A las 430 horas la eficiencia del biofiltro era del 100%. Sin embargo, una observación macroscópica indicó la presencia de contaminación (un hongo negro) por lo que se terminó el experimento. Este hongo probablemente crece empleando el metanol y ciertos materiales celulares de la levadura como fuente de carbono y sales, ya que, la biomasa de levadura cuantificada al tiempo final fue menor que la obtenida a las 307 horas (tabla 4.10). Nuevamente el pH final de 2.7, indica la producción de ácidos intermediarios poco volátiles, probablemente, ácido fórmico.

Se realizó un balance de carbono (tabla 4.11) considerando a la biomasa de las 307 horas como biomasa final y la composición elemental de la levadura: C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>0.6</sub>O<sub>2</sub> [Atkinson y Mavituna 1991])

Tabla 4.11 Balance de carbono.

<b>Sustrato</b>	<b>Productos</b>	
	CO <sub>2</sub> (g C) (% del C consumido)	Biomasa (g C) (% del C consumido)
Metanol consumido (g C)	1.86 (56.7%)	0.17 (5.3%)

El fenómeno de secado pudo deberse al calor metabólico generado por la oxidación del metanol y a que el aire de alimentación no estaba completamente saturado de humedad (por lo que este fue más intenso cuando el flujo se incrementó alcanzando tiempos de residencia de 80 seg). Los flujos de alimentación empleados son pequeños. Esto se refleja en tiempos de residencia altos, 80 –150 segundos, en comparación con los reportados en la literatura para procesos de biofiltración convencional que varían entre 20 - 60 segundos. Esto puede apoyar la hipótesis de que a flujos altos se promovía el secado por lo que disminuía la CE del biofiltro o indicar que la velocidad de consumo de metanol era lenta.

En los dos experimentos descritos anteriormente, se obtuvo un pH final alrededor de 2.7 (un resultado similar se presentó en el resto de los experimentos). Cuando se evaluó el efecto del pH en el consumo de metanol (ver sección 4.4), se determinó que la velocidad de consumo del oxígeno se mantiene constante a pH's entre 2 y 5. Además, se determinó que, para evitar riesgos de contaminación bacteriana (aunque no fúngica) es recomendable trabajar a un pH entre 2 y 4 .Por esta razón el pH, en las columnas de biofiltración, se monitoreo pero no se trató de modificar lográndose evitar la contaminación bacteriana.

#### **4.6.3 INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE AGUA Y/O MEDIO MINERAL Y DEL MEZCLADO.**

Se estima que el 75% de todos los problemas en biofiltración son causados por un deficiente control de la humedad (Auria *et. al.* 1998). Con el fin de establecer un procedimiento para afrontar esta dificultad, se evaluó el efecto de la adición de agua o

---

de medio YNB (33.5 g/L) así como del mezclado, durante el transcurso del proceso, en la ER.

Se empacaron columnas con bagazo de caña de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.7.2. En las columnas se probó:

- a) Adición de YNB con mezclado (YNB-CM)
- b) Adición de YNB sin mezclado (YNB-SM).
- c) Adición de agua sin mezclado (Agua-SM).

Las condiciones iniciales de las columnas fueron: pH 4.94, biomasa 0.63 mg/ g<sub>soporte seco</sub> y humedad relativa de 66.1%.

La carga se modificó primero mediante la concentración del flujo de alimentación, hasta obtener concentraciones en la fase gas de 6 g/m<sup>3</sup> y después incrementando el flujo de alimentación. Los flujos empleados fueron: 4.8x10<sup>-3</sup>, 5.4x10<sup>-3</sup> y 6.6x10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>/h. En la fig. 4.17 se muestra el comportamiento de la carga y de la ER a lo largo del experimento el cual duró 526 horas, Además se aprecia que a las 408 horas hubo una fuga en el humidificador, por lo que las columnas se quedaron sin alimentación de aire y metanol por unas 15 horas. En la figura 4.18 se presenta la producción de CO<sub>2</sub> para cada condición evaluada.

En la figura 4.17 se observa que, en los casos YNB-CM y YNB-SM, durante las primeras 200 horas la ER se mantuvo entre 90-100%. A las 285 horas se detectó una caída (entre el 70-80%) de la ER. Al analizar una muestra homogénea de la columna YNB-CM se determinó que la humedad relativa en el soporte estaba entre el 52-58% por lo que se adicionó medio YNB (ver sección 3.7.2) en ambas columnas a las 293 hrs. Después de la adición de YNB, la humedad de saturación del soporte se restableció al 66.7% y la ER mejoró hasta alcanzar el 100% durante los 2 - 3 días siguientes.

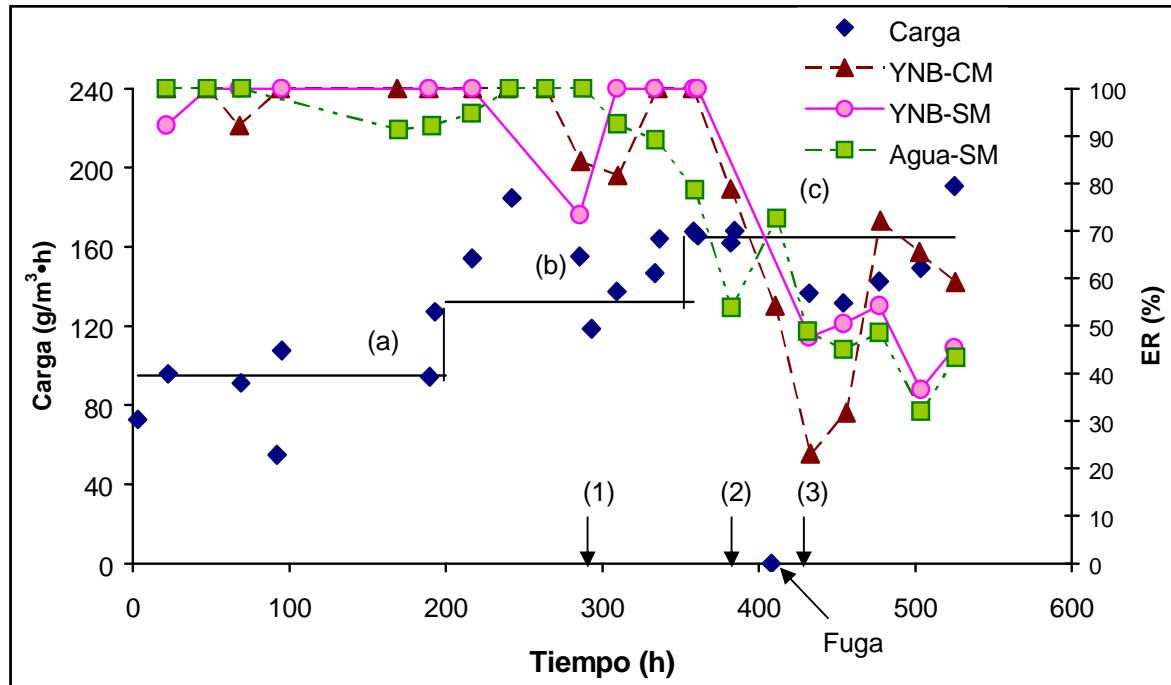


Fig.4.17. Comportamiento de la carga y la eficiencia de remoción en un biofiltro con bagazo de caña. Flujos de alimentación: (a):  $4.8 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ ; (b):  $5.4 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$  y; (c):  $6.6 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ . Condición: (1) Adición de YNB en los experimentos YNB-CM y YNB-SM, (2) adición de agua en el experimento Agua-SM y, (3) adición de agua en los experimentos YNB-CM y YNB-SM.

Posteriormente, la ER disminuyó nuevamente y la fuga que se presentó a las 408 horas aceleró su caída alcanzándose valores entre 20 – 40 % por lo que se realizó una segunda intervención a las 435 horas que consistió en la adición de agua sin mezclado. Esta intervención mejoró un poco la ER y después de 48 horas su valor estaba entre el 50-70%, sin embargo, a las 480 horas la ER vuelve a caer y se concluye el experimento.

Para el caso Agua-SM, la ER se mantuvo entre el 90 – 100 % durante las primeras 300 horas después de las cuales este parámetro empezó a disminuir alcanzando un valor de 54% a las 380 horas. A las 384 horas se adicionó agua sin mezclado y para las 411 hrs. se detectó una mejoría en la ER (73 %). Sin embargo, 40 horas más tarde la ER es del 49%. Esto podría deberse a la falta de alguna sal mineral o a que la fuga que se

presentó en la corriente de alimentación a las 408 horas afectó la columna. La ER continuó disminuyendo hasta alcanzar valores entre 30 – 50 % por lo que a las 525 horas el experimento se concluyó.

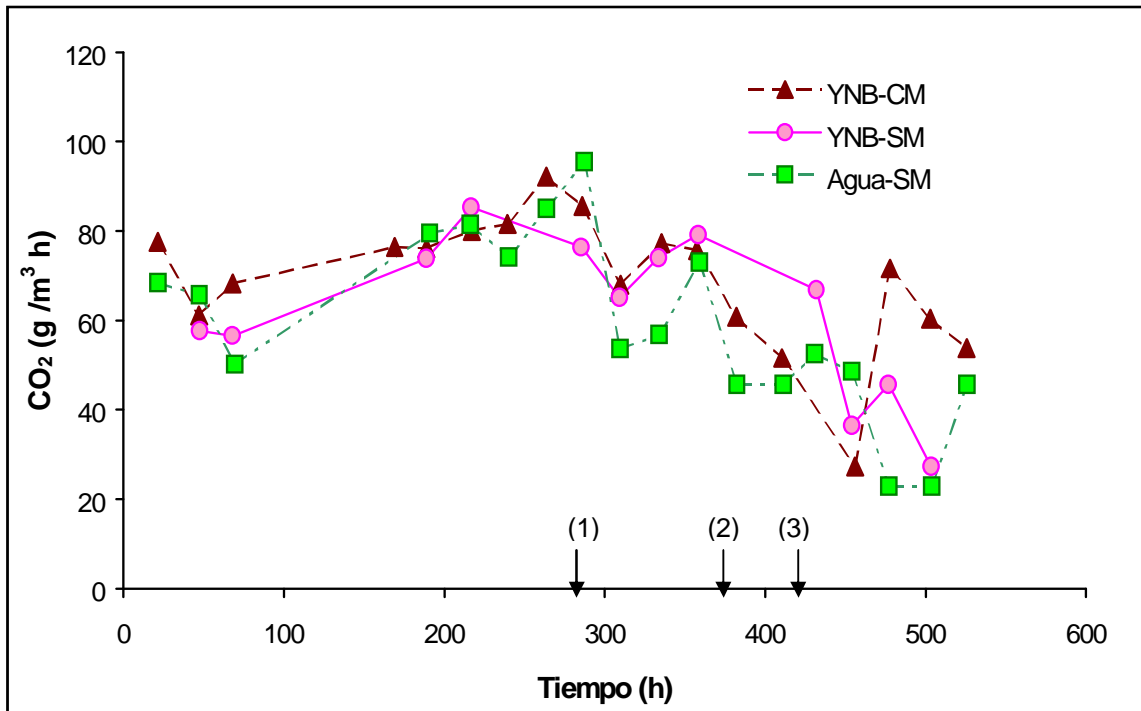


Fig. 4.18 Producción de CO<sub>2</sub>. 1) Adición de YNB en los experimentos YNB-CM y YNB-SM, (2) adición de agua en el experimento Agua-SM y, (3) adición de agua en los experimentos YNB-CM y YNB-SM.

En los tres casos, se logró obtener una capacidad de eliminación máxima entre 150-165 g/m<sup>3</sup>·h la cual se logró mantener durante 70 horas aproximadamente. Respecto a la generación de CO<sub>2</sub> (figura 4.18), esta fue muy similar en todos los casos y presentó una estrecha relación con el comportamiento de la ER.

El valor del pH, la humedad y la biomasa al tiempo final se muestran en la tabla 4.12. El balance de carbono se presenta en la tabla 4.13 en donde se incluye al formaldehído, un intermediario volátil que se detectó a partir de las 220 horas.

Los datos del balance de carbono (tabla 4.13) indican que en las columnas YNB-CM y YNB-SM el consumo de metanol (4.27 y 4.21 g C), la producción de CO<sub>2</sub> (1.86 y 1.66 g C) y la generación de biomasa (0.21 y 0.22 gC correspondientes a 24.2 y 26.0 mg<sub>biomasa</sub>/g<sub>soporte seco</sub>) fue prácticamente la misma.

Tabla 4.12 Condiciones al tiempo final del proceso.

Condición	pH	Humedad relativa (%)	Biomasa (mg/g soporte seco)
YNB-CM	2.80	69.4	24.2
YNB-SM	2.77	71.4	26.0
Agua-SM	2.77	70.0	21.9

Tabla 4.13. Balance de carbono.

Condición	Sustrato Metanol consumido (g C)	Productos		
		CO <sub>2</sub> (g C) (% del C consumido)	Formaldehído (g C) (% del C consumido)	Biomasa (g C) (%) del C consumido)
YNB-CM	4.27	1.86 (43.4%)	0.42 (9.8%)	0.21 (4.87%)
YNB-SM	4.21	1.66 (39.5%)	0.45 (10.8%)	0.22 (5.83%)
Agua-SM	3.96	1.73 (43.7%)	0.28 (6.98%)	0.19 (4.75%)

Para el caso de las columnas YNB-SM y Agua-SM, el balance de carbono permite advertir que el consumo de metanol fue solamente 6% superior cuando se adicionó YNB en comparación con la adición de agua (4.21 y 3.96 gC). La adición de YNB tuvo mayor influencia sobre la generación de biomasa ya que fue 14% mayor que en la columna con adición de agua ( 0.22 y 0.19 g C lo que corresponde a 26.0 y 21.9 mg<sub>biomasa</sub> / g<sub>soporte seco</sub> respectivamente). Para corroborar la influencia de la adición de YNB en la generación de biomasa en la sección 4.6.5 se estudia la influencia de la adición periódica de YNB y agua en la biofiltración.



Los resultados permiten concluir que si se requiere realizar la adición de agua o de medio mineral, ya sea para contrarrestar los efectos del secado y/o favorecer la generación de biomasa, esto puede realizarse mediante una adición sin mezclado. Esto representa una ventaja ya que se simplifica el proceso de intervención y se disminuye el riesgo de contaminación. Además, si se considera el proceso a mayor escala, resulta interesante considerar que se podría adicionar YNB, sin mezclado, para incrementar la producción de biomasa y por tanto, la ER.

#### 4.6.4 INFLUENCIA DEL SOPORTE SOBRE LA EFICIENCIA DE REMOCION Y LA GENERACION DE BIOMASA.

Con la finalidad de determinar si el soporte influye en el proceso de biofiltración, se empacaron columnas de 0.2 L (volumen útil), con bagazo de caña y perlita según se describe en la sección 3.7.2. El manejo y comportamiento de la carga fue igual a la descrita en la fig 4.17.

Las condiciones iniciales se presentan en la tabla 4.14.

Tabla 4.14 Condiciones iniciales.

<b>Soporte</b>	<b>pH</b>	<b>Humedad relativa (%)</b>	<b>Biomasa (mg/ g<sub>soporte seco</sub>)</b>
Bagazo de caña	4.94	66.1	0.63
Perlita	5.82	66.4	0.47

El comportamiento de la ER y la producción de CO<sub>2</sub> durante el experimento se presentan en las figuras 4.19 y 4.20 respectivamente.

En la figura 4.19 se observa que la ER se mantuvo entre el 90 – 100% durante las primeras 250 horas después de las cuales la ER comenzó a disminuir alcanzando valores entre 70 – 80 %. Por ello, a las 293 hrs. se adicionó YNB con mezclado (entre

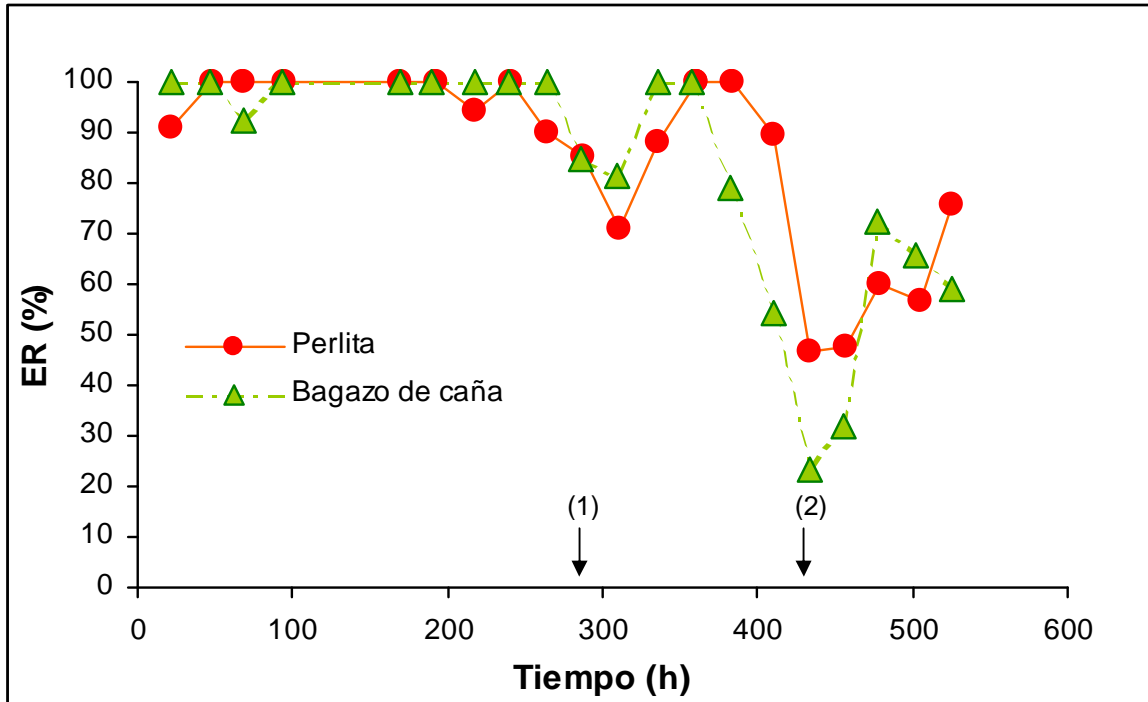


Fig. 4.19 Influencia del soporte en la eficiencia de remoción. (1) Adición de YNB con mezclado (2) adición de agua sin mezclado.

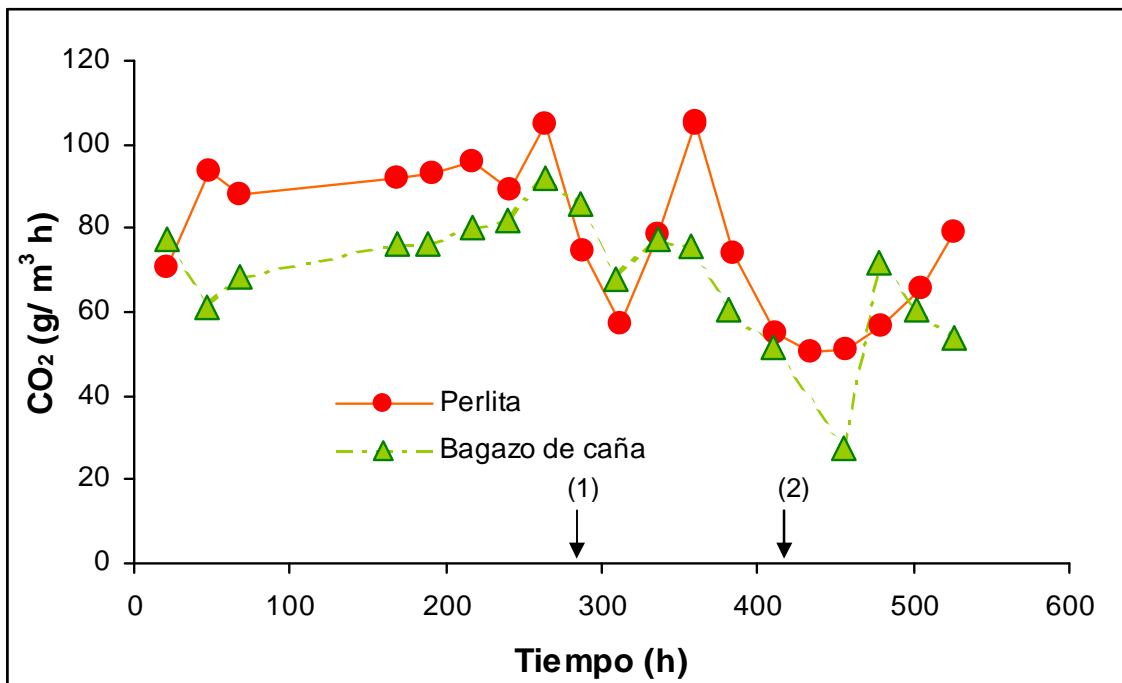


Fig. 4.20 Influencia del soporte en la producción de CO<sub>2</sub>. (1) Adición de YNB con mezclado, (2) adición de agua sin mezclado.

12- 15 mL en cada columna) con lo cual la remoción de metanol mejoró alcanzando valores entre 90 – 100%. Así se mantuvieron las columnas por 2 días después de los cuales la ER nuevamente decayó hasta valores entre 20 – 50% siendo esta caída menos drástica en la columna con perlita. Para mejorar la ER, se adicionó agua (10 - 12 mL sin mezclado a cada columna) a las 435 hrs. con lo que después de 48 hrs. la ER se incrementó al 60 - 70 %. Sin embargo, para el caso de la columna con bagazo, después de 48 hrs. la ER nuevamente empezó a disminuir en tanto que, en la columna con perlita la remoción del metanol aumentó hasta 75% al tiempo final. La  $CE_{m\acute{a}x}$  en perlita fue de  $190 \text{ g/m}^3\cdot\text{h}$  durante 48 hrs. y en bagazo de  $158 \text{ g/m}^3\cdot\text{h}$  por 69 hrs.

La producción de  $\text{CO}_2$  (fig. 4.20) estuvo directamente relacionada con la ER y, fue claramente superior, cuando se empleo la perlita como soporte.

Las condiciones finales se presentan en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 Condiciones finales.

Soporte	pH	Humedad relativa (%)	Biomasa (mg/ $\text{g}_{\text{soporte seco}}$ )
Perlita	2.84	65.8	32.2
Bagazo de caña	2.80	69.4	24.2

Tabla 4.16. Balance de carbono.

Soporte	Sustrato	Productos		
		$\text{CO}_2$ (g C) (% del C consumido)	Formaldehído (g C) (% del C consumido)	Biomasa (g C) (% del C consumido)
Perlita	Metanol consumido (g C) 4.59	2.19 (47.6%)	0.33 (7.22%)	0.33 (7.27%)
Bagazo de caña	4.27	1.86 (43.4%)	0.42 (9.8%)	0.21 (4.87%)

El consumo de metanol fue similar para los dos soportes (4.59 y 4.27 gC, tabla 4.16). Su influencia se refleja al comparar la producción de  $\text{CO}_2$  y biomasa ya que se produjo 17% más  $\text{CO}_2$  (2.19 y 1.86 gC) y 57% más biomasa (0.33 y 0.21 gC) con perlita. Sin embargo, aparentemente la biomasa presente en el bagazo de caña fue más activa ya

que relacionando la  $CE_{m\acute{a}x}$  y la biomasa presente en cada sistema, se obtuvieron velocidades de consumo de  $56.5 \text{ mg}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$  en perlita y de  $74.2 \text{ mg}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$  en bagazo. Además, con perlita se generó menos formaldehído (0.33 vs. 0.42 g C) el cual se detectó a partir de las 200 horas. Así, aunque en bagazo la velocidad de consumo fue mayor, la oxidación biológica del metanol fue menos eficiente. Esto se refleja en la producción de  $\text{CO}_2$  ya que, durante la primeras 250 hrs la ER fue similar en ambos soportes pero la generación de  $\text{CO}_2$  fue mayor con perlita.

Así, los resultados indican que la perlita, a diferencia del bagazo de caña, favorece la oxidación completa del metanol y la generación de biomasa, aunque, *P. methanolica* fue biológicamente más activa en bagazo de caña.

Probablemente, el área superficial de la perlita sea mayor que la del bagazo. Así, la disponibilidad de metanol y oxígeno fue mejor en la perlita por lo que la oxidación del metanol fue más eficiente.

Devinny *et. al* (1999) reportan que, para el caso de compuestos hidrofílicos, es muy probable que el oxígeno sea un factor limitante en el proceso de remoción del contaminante debido a que la solubilidad del oxígeno es muy baja (7.53 mg/L a 30°C y 1 atm.) y el coeficiente de partición de este gas es de 33.5, lo que significa que la mayor parte de oxígeno se encuentre en la fase gaseosa y sólo una pequeña fracción se disuelva en la fase líquida contenida en el soporte. Yang *et. al.* (2002) evaluaron el efecto del oxígeno en la biofiltración de metanol reportando que al trabajar a una concentración de  $1.66 \text{ g}/\text{m}^3$  y una carga de  $200 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$ , la CE mejoraba de 120 a  $145 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$  al incrementar el % de oxígeno de la corriente de alimentación de 21 a 63%.

Puesto que se está trabajando con un cultivo puro, un factor importante es la presencia de contaminación en el biofiltro. Trabajar a un pH bajo limitó la presencia de bacterias pero no la de hongos y, no se observó que algún soporte favoreciera la contaminación.

El empleo de aire no estéril y la necesidad de intervenir frecuentemente las columnas propició la contaminación.

Empleando el valor de  $q_s = 0.066 \text{ g}_{\text{metanol}} / \text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$  (sección 4.5.1) y el valor de biomasa máxima al tiempo final en perlita y bagazo de caña (columna YNB-SM) es posible realizar una estimación de la capacidad de eliminación en el biofiltro. Los resultados se muestran en la tabla 4.17.

Tabla 4.17. Estimación de la  $CE_{\text{teórica}}$  partiendo de la biomasa máxima alcanzada en los soportes evaluados vs. la  $CE_{\text{experimental}}$ .

Soporte	Biomasa (mg/ g soporte seco)	$CE_{\text{teórica}}$ (g/m <sup>3</sup> h)	$CE_{\text{experimental}}$ (g/ m <sup>3</sup> h)
Perlita	32.2	220	190
Bagazo	26.0	154	165

Los resultados indican que el valor de la  $CE_{\text{experimental}}$  es muy próximo al de la  $CE_{\text{teórica}}$ . Es probable que la discrepancia entre estos valores se deba a la cuantificación de la biomasa ya que al ser por conteo celular tiene un gran margen de error. Sin embargo, es posible advertir que la determinación de la capacidad de la levadura de consumir el metanol en medio líquido es una herramienta útil para estimar su comportamiento en el biofiltro.

#### 4.6.5 INFLUENCIA DE LA ADICION PERIODICA DE MEDIO YNB O AGUA.

Con base en los resultados obtenidos en la sección 4.6.3 y 4.6.4 se realizó un experimento en el cual se empleó perlita como soporte y se adicionó, cada dos días y sin mezclado, YNB o agua para mejorar y evitar la caída de la capacidad de remoción así como favorecer la producción de biomasa.

La carga se fue incrementando mediante la concentración de metanol según se especifica en las figuras 4.21 y 4.22. El flujo de alimentación fue, durante todo el experimento de  $5.4 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ . Las condiciones al tiempo cero fueron: pH 6.02, humedad 66.4% y biomasa  $0.53 \text{ mg/g}_{\text{soporte seco}}$ .

En la figura 4.21 se presenta el comportamiento de la carga, ER y  $\text{CO}_2$  de la columna adicionada con agua. La figura 4.22 representa la evolución de los mismos parámetros en la columna con adición de medio YNB.

En la columna con adición periódica de agua (fig 4.21), la ER se mantuvo al 100% durante las primeras 287 horas lo que correspondió a una  $\text{CE}_{\text{máx}}$  de  $130 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$  durante 24 horas. Después la ER comenzó a disminuir y a las 358 hrs. la columna era eficiente en un 57%. Debido a que durante el proceso de adición de agua se presentó un fenómeno de percolación (aproximadamente 1 mL de los 4-5mL adicionados llegaban a

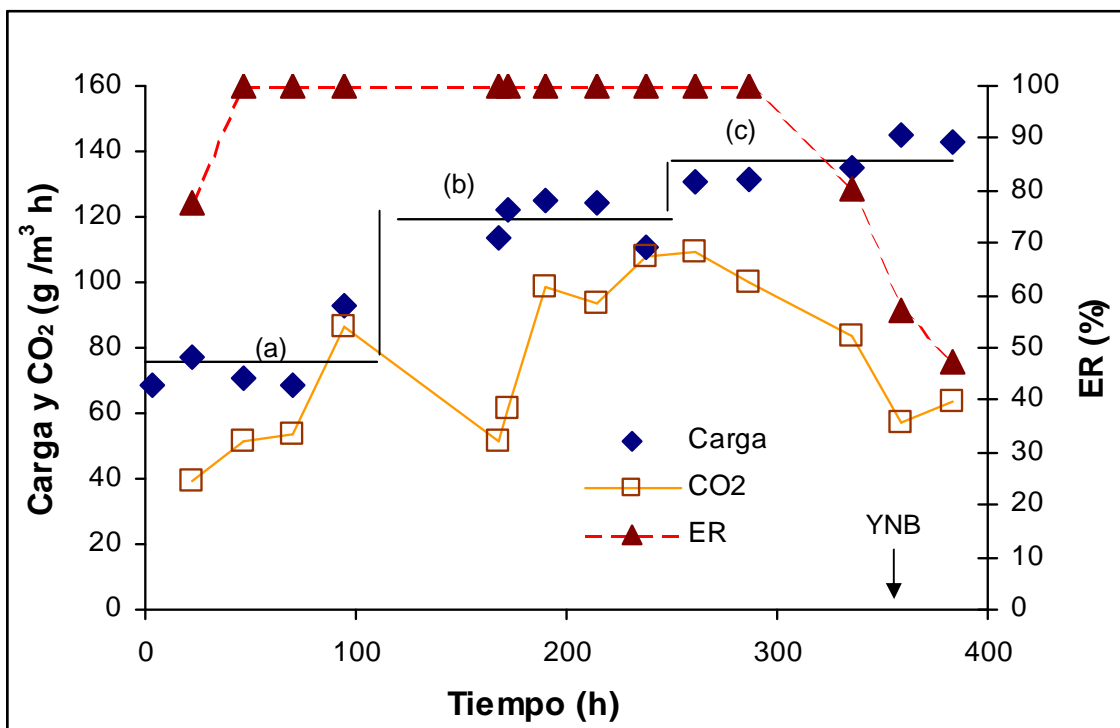


Fig. 4.21 Comportamiento de la carga, ER y  $\text{CO}_2$  en una columna con adición de agua cada 2 días. Concentraciones de metanol: (a)  $2.8 \text{ g/m}^3$ , (b)  $4.4 \text{ g/m}^3$  y (c):  $5.1 \text{ g/m}^3$ .

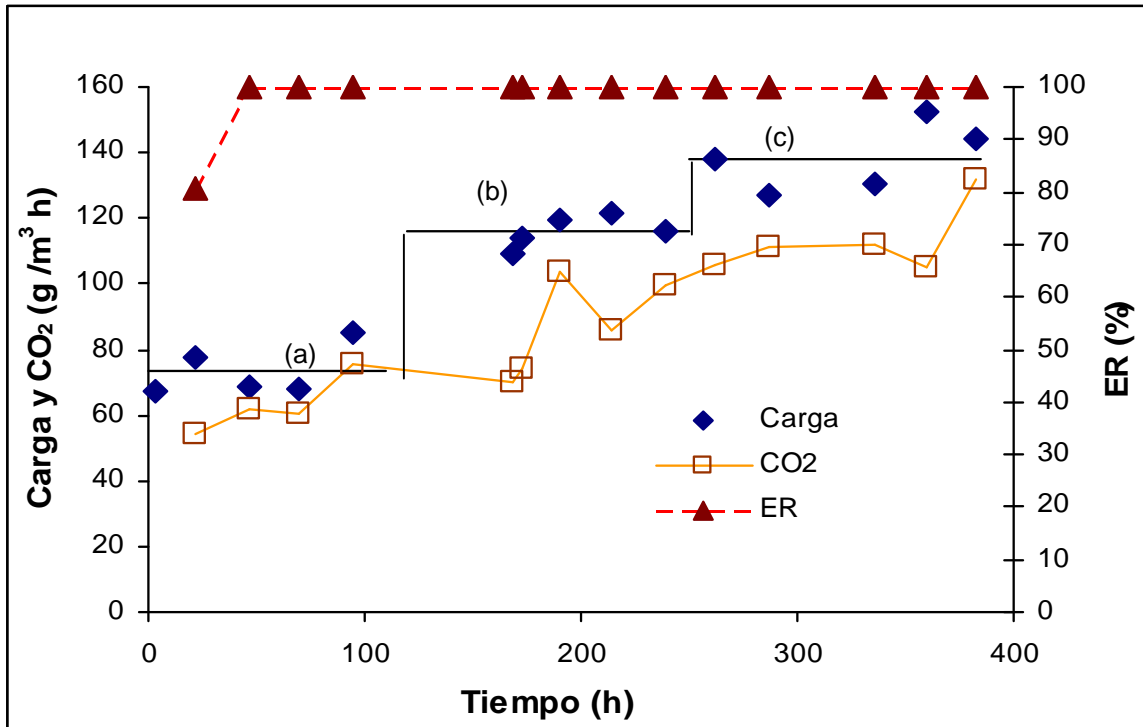


Fig. 4.22 Comportamiento de la carga, ER y CO<sub>2</sub> en una columna con adición de YNB cada 2 días. Concentraciones de metanol: (a) 2.8 g/m<sup>3</sup>, (b) 4.4 g/m<sup>3</sup> y (c): 5.1 g/m<sup>3</sup>.

drenar) se decidió adicionar 5 mL de medio YNB para determinar si la caída en la ER se debía a una deficiencia de sales minerales. Sin embargo, el monitoreo de la columna 24 horas más tarde indicó que la ER continuaba disminuyendo (47%), es decir, el proceso no estaba limitado por sales minerales. En ese momento se concluyó el experimento.

En la columna que se estaba adicionando medio YNB (fig. 4.22), la ER se mantuvo al 100% durante todo el proceso alcanzándose una  $CE_{m\acute{a}x}$  de 142 g/m<sup>3</sup>·h por 48 horas (en esta columna también hubo un drenado de aproximadamente 1 mL). A las 380 horas se detectó un punto de contaminación fúngica en la parte inferior de la columna por lo que se concluyó el monitoreo.

Las condiciones finales se presentan en la tabla 4.18 y en la tabla 4.19 se muestra el balance de carbono.

Tabla 4.18 Condiciones finales

Condición	pH	Humedad (%)	Biomasa (mg/g soporte seco)
Adición de agua	3.71	67.5	9.57
Adición de YNB	3.1	64.6	18.5

Tabla 4.19 Balance de carbono

Condición	Sustrato	Productos		
	Metanol consumido (g C)	CO <sub>2</sub> (g C) (% del C consumido)	Formaldehído (g C) (% del C consumido)	Biomasa (g C) (% del C consumido)
Adición de agua	2.88	1.48 (51.2%)	0.35 (12.1%)	0.09 (3.30%)
Adición de YNB	3.08	1.68 (54.4%)	0.31 (9.96%)	0.19 (6.12%)

Los resultados indican que la adición periódica de YNB favorece la producción de biomasa ( $18.49 \text{ mg}_{\text{biomasa}} / \text{g}_{\text{soporte seco}}$ ) en comparación con la adición periódica de agua ( $9.57 \text{ mg}_{\text{biomasa}} / \text{g}_{\text{soporte seco}}$ ). Sin embargo comparando este primer dato con el resultado de biomasa final en la columna de perlita con adición de YNB-CM (sección 4.6.4, tabla 4.15) que fue de  $32.22 \text{ mg}_{\text{biomasa}} / \text{g}_{\text{soporte seco}}$ , es posible apreciar una concentración de biomasa muy superior en el último caso. Esto puede deberse a que la adición frecuente de medio YNB, con la consiguiente percolación del líquido lavó la biomasa de la columna por lo que su rendimiento fue menor. El efecto del lavado también se puede apreciar en el pH de 3.7 (superior a los casos previos en donde fue de 2.7) lo que manifiesta una menor acumulación de compuestos intermediarios ácidos. Además la frecuente intervención en las columnas representa un mayor riesgo de contaminación. Como se mencionó anteriormente, a las 380 horas se detectó la presencia de contaminación fúngica en la columna adicionada con medio YNB. Un evento análogo se presentó en el duplicado de la columna con adición de agua. Observaciones al microscopio óptico indicaron que se trataba de dos hongos, uno probablemente del género *Aspergillus* y otro del género *Penicillium* estando el primero en mayor



proporción. Con el interés de evaluar la eficiencia de este hongo para consumir el metanol (lo que significaría un proceso de biofiltración en el sentido estricto) se continuó monitoreando estas columnas durante 34 días más. Los resultados se presentan en la sección 4.6.7.

#### **4.6.6 ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE BIOFILTRACIÓN CON *P. methanolica*.**

Para evaluar el comportamiento del proceso a mayor escala, se empleó una columna con un volumen útil de 1.1L empacada con perlita. La columna contó con un sistema de spray para poder adicionar, de manera homogénea, medio YNB cada dos días. El volumen de cada adición fue de 30 – 40 mL.

Las condiciones iniciales fueron: pH 5.95, humedad 70% y biomasa 0.60 mg/ g<sub>soporte seco</sub>.

La carga se fue modificando mediante la concentración de metanol. El flujo de alimentación fue de  $2.7 \times 10^{-2}$  m<sup>3</sup>/h lo que representa un tiempo de residencia de 146 seg. En la figura 4.23 se muestra el comportamiento de la carga, ER y CO<sub>2</sub> a lo largo del proceso que duró 287 horas.

La ER se mantuvo al 100% de las 46 a las 167 horas alcanzándose en este periodo una capacidad de eliminación máxima de 106 g/m<sup>3</sup>·h que se mantuvo así por 65 horas. Después de esta etapa, la ER comenzó a disminuir hasta alcanzar a las 180 horas una ER del 80%. A las 190 horas se tomo (haciendo un mezclado previo del soporte en condiciones estériles) una muestra homogénea del soporte con el fin conocer las condiciones en la columna. Los resultados fueron: pH 3.57, humedad 63% y biomasa 14.7 mg/g<sub>soporte seco</sub>.

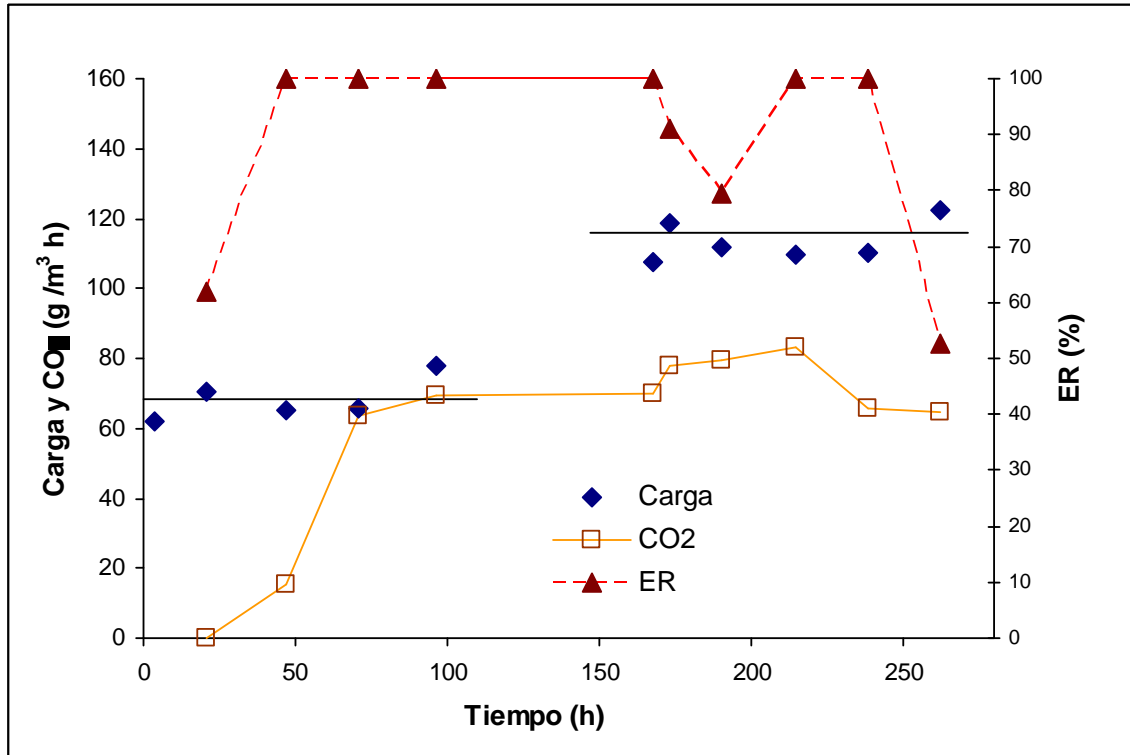


Fig. 4.23 Comportamiento de la carga, la ER y el CO<sub>2</sub> en un sistema de 1.1L. (a) 2.8 g/m<sup>3</sup>, (b) 4.6 g/m<sup>3</sup>.

Al día siguiente a la intervención, se observó una mejoría en la ER la cual se mantuvo al 100% por 24 horas (CE de 110 g/m<sup>3</sup>·h) por lo que es posible que la biomasa o las sales minerales no estuvieran distribuidas homogéneamente en la columna. Después de este periodo la ER disminuyó nuevamente y a las 287 horas se detectó la presencia de contaminación fúngica por lo que finalizó el experimento.

El balance de carbono se presenta en la tabla 4.20.

Tabla 4.20 Balance de carbono.

Sustrato	Productos		
	CO <sub>2</sub> (g C) (% del C consumido)	Formaldehído (g C) (% del C consumido)	Biomasa (g C) (% del C consumido)
Metanol consumido (g C)	4.13 (46.0%)	0.97 (10.8%)	0.15 (1.66%)
8.97			

La CE evaluada teóricamente (a partir de la  $q_s$ , sección 4.5.1, y una biomasa de 14.7 mg/g<sub>soporte</sub>) es de 101 g/m<sup>3</sup>•h. Este valor corresponde al 92% del valor de CE<sub>máx</sub> experimental que fue de 110 g/m<sup>3</sup>•h. Sin embargo, este valor es bajo en comparación con los obtenidos en este trabajo y los reportados por Shareefdeen *et. al.* (1993), Thalasso *et. al* (1999), Mohseni y Grant (2000) y Cornabé *et. al* (2002) ( tabla 2.8). Esto puede deberse a que la contaminación fúngica, a temprana hora, limitó la generación de biomasa y por ello, el consumo del metanol.

No se repitió el experimento pero esta experiencia indica que al escalar un proceso de esta naturaleza, en más complicado mantener condiciones estériles que limiten la presencia de microorganismos contaminantes. Con el fin de promover la adaptación de la levadura y disminuir el riesgo de contaminación, podría considerarse inocular la columna con levadura crecida en metanol, inocular masivamente el reactor e iniciar con una concentración de metanol más alta.

#### **4.6.7 BIOFILTRACION FUNGICA DEL METANOL.**

Se evaluó la capacidad de eliminación de metanol por los hongos detectados en 2 columnas de experimentos previos (sección 4.6.5).

A una de ellas se le había estado adicionando agua y a la otra medio YNB cada dos días así que se continuó con este protocolo. La carga se fue incrementando mediante la concentración de metanol alcanzándose al tiempo final concentraciones de 9.2 g/m<sup>3</sup>. El flujo de alimentación fue de 5.4x10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>/h (tiempo de residencia de 133 seg) a excepción de la columna adicionada con YNB en que se emplearon flujos de 8.1x10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>/h (tiempo de residencia de 88 seg) del día 25-36 y de 6x10<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>/h (tiempo de residencia de 120 seg) del día 36-50.

En las figuras 4.24 y 4.25 se muestra la evolución de la carga, ER y CO<sub>2</sub> en las columnas considerando que la contaminación se presentó en el día 16.

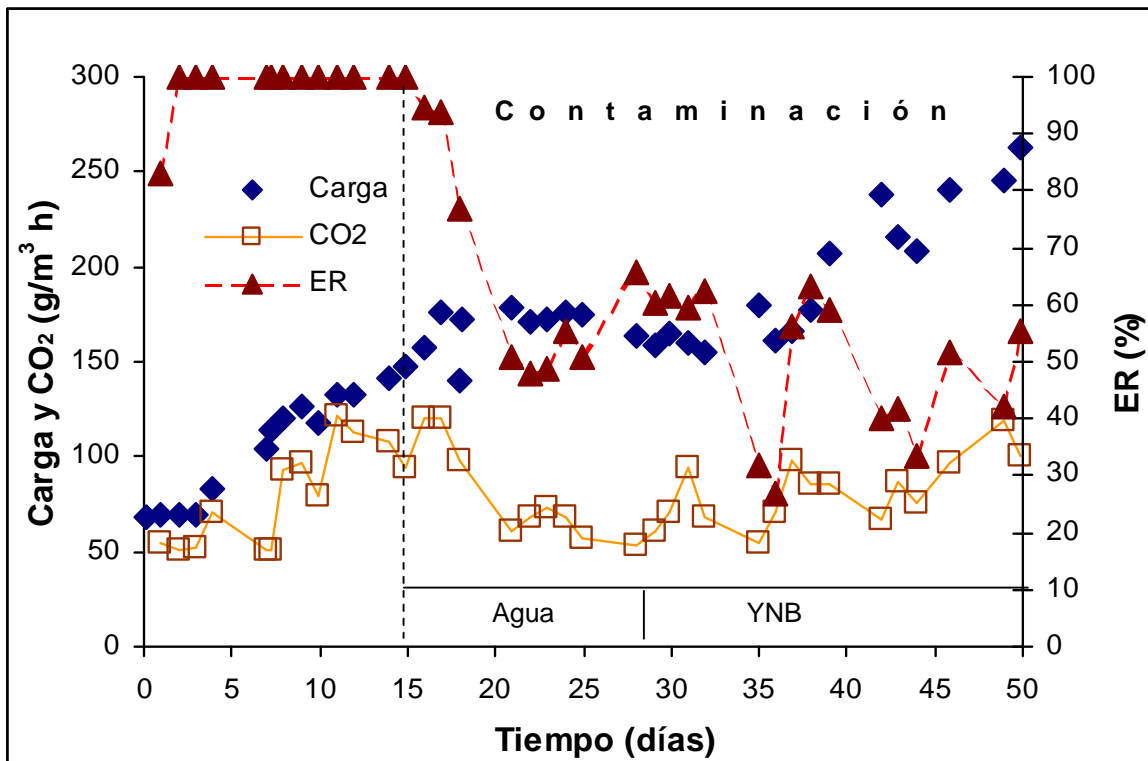


Fig. 4.24 Comportamiento de la carga, ER y el CO<sub>2</sub> en una columna contaminada con adición de agua cada 2 días.

Para el caso de la columna con adición periódica de agua, después de 16 días comenzó a caer la ER hasta valores de 50% por lo que a partir del día 28 se empezó a adicionar medio YNB para ver si tal caída se debía a la falta de sales minerales (fig 4.24). Sin embargo, la ER de la columna no se recuperó completamente y se mantuvo alrededor del 50% aun cuando se continuó incrementando la carga. La CE máxima en esta columna fue de 150 g/m<sup>3</sup>·h por un periodo de 72 horas.

La columna con adición periódica de YNB mantuvo ER del 100% hasta el día 25. Después la ER comenzó a disminuir hasta alcanzar un valor mínimo de 35% al día 35 (fig 4.25). Tal disminución estuvo ligada al incremento del flujo de alimentación. Así, al disminuir nuevamente el flujo de alimentación la ER se recuperó y al día 38 era del 100%. Finalmente la ER comenzó a bajar lentamente y al final del experimento su valor era del 74%.

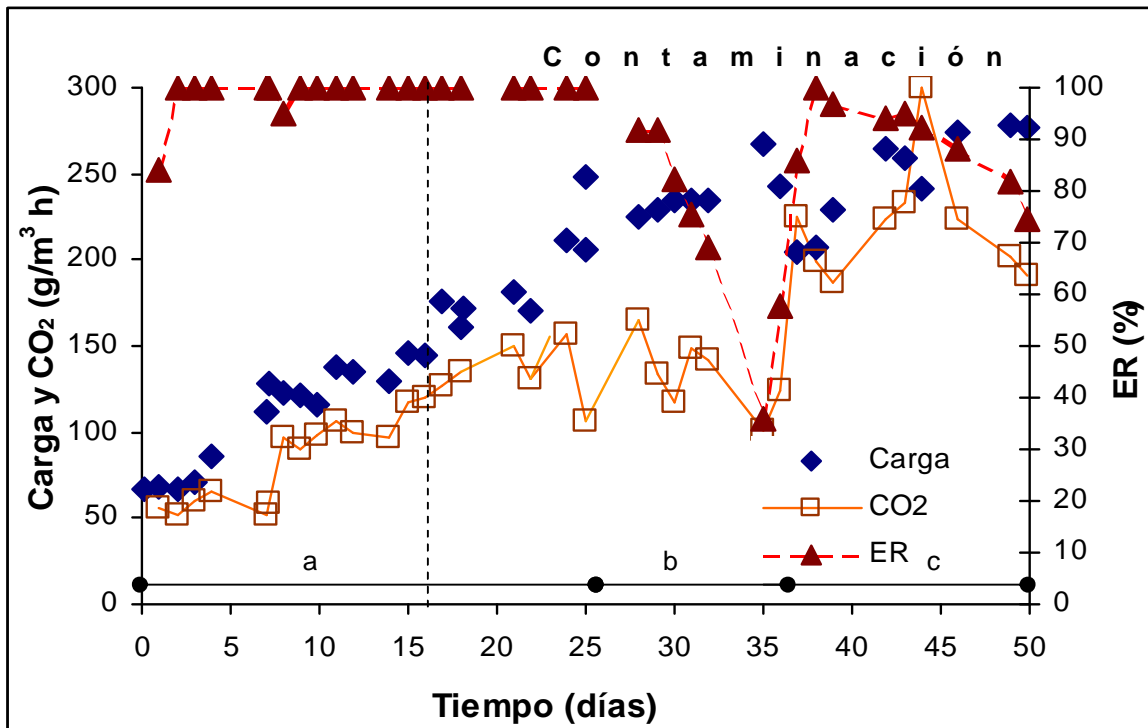


Fig. 4.25 Comportamiento de la carga, ER y el CO<sub>2</sub> es una columna contaminada con adición de YNB cada 2 días. Flujo de alimentación (a)  $5.4 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ , (b)  $8.1 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$  y (c)  $6 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ .

A partir del día 31 se detectó formaldehído en la corriente de salida de la columna (datos no mostrados) indicando que probablemente la reacción de oxidación del metanol fue limitada por oxígeno. La presencia de formaldehído estuvo ligada a la caída de la ER debido, seguramente, a su efecto tóxico sobre el hongo.

Al final del proceso la humedad relativa de la columna fue del 71% y el pH de 3.86. No se detectó la presencia de contaminación bacteriana, seguramente debido al pH bajo.

En esta columna se obtuvo una CE máxima de  $235 \text{ g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  durante 10 días. Una CE similar sólo ha sido reportada por Mohseni y Grant (2000) y Sologar *et. al.* (2003) (tabla 1.8).

Considerando que la relación estequiométrica de la oxidación completa del metanol es 1:1 (por cada g de C del metanol se produce 1 g de C en forma de CO<sub>2</sub>) se graficó la CE como  $\text{g C}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  vs. CO<sub>2</sub> en  $\text{g C}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  para la columna adicionada con YNB (fig. 4.26). En

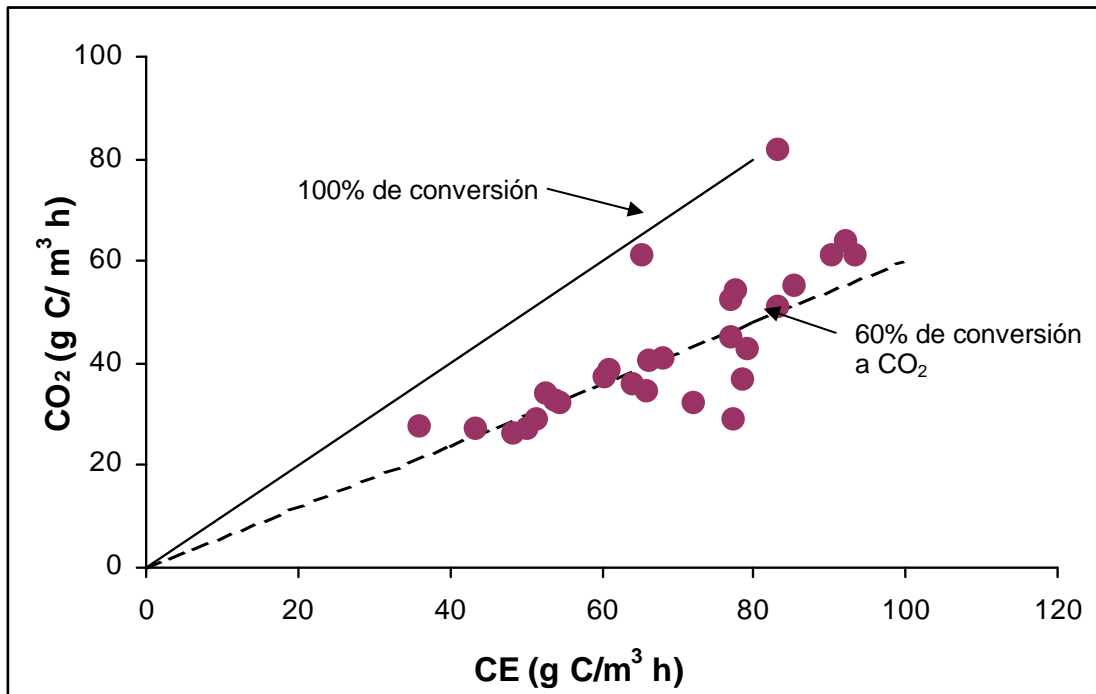


Fig. 4.26 Grado de conversión del metanol a CO<sub>2</sub> en columna contaminada por el hongo *Aspergillus sp.* y con adición periódica de YNB.

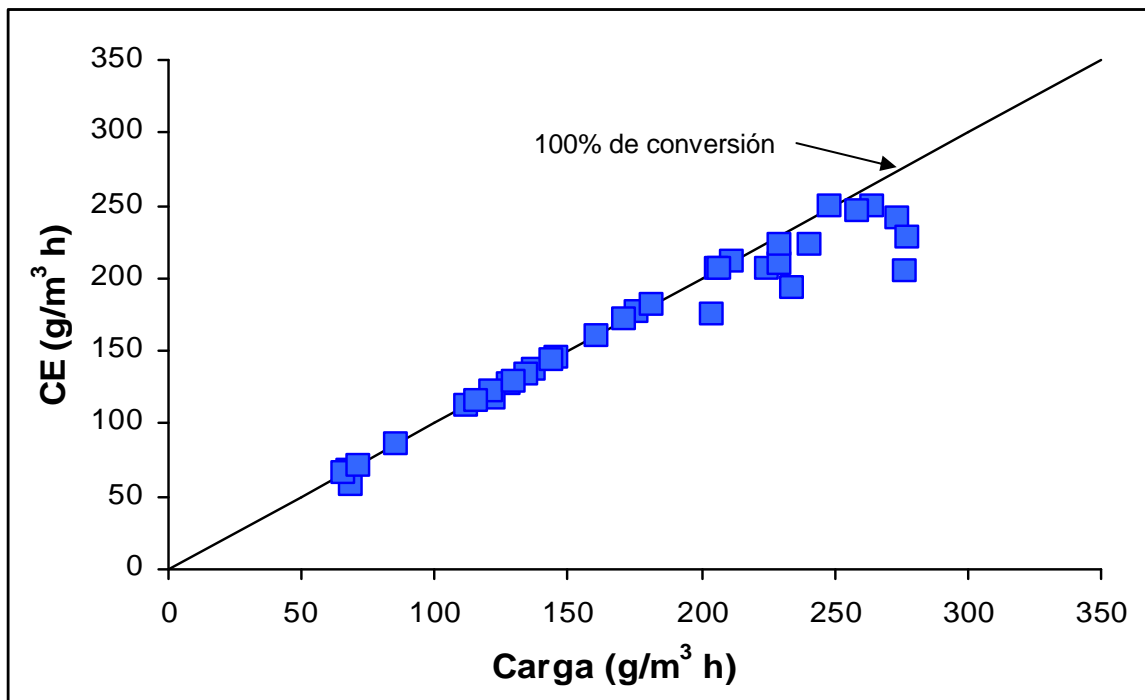


Fig. 4.27. Relación entre la capacidad de eliminación y la carga en columna contaminada por el hongo *Aspergillus sp.* y con adición periódica de YNB.

ella se observa que la densidad de puntos indica un nivel de conversión de metanol a CO<sub>2</sub> del 60%. Además, en la figura 4.27 se observa que a cargas de hasta 200 g/m<sup>3</sup>•h la ER fue del 100% (carga crítica).

Con el objeto de identificar los hongos se tomo una muestra de cada columna al día 18. Se realizaron observaciones al microscopio óptico y se determinó que probablemente uno de los hongos pertenece al genero *Aspergillus* (una inspección visual de las columnas al tiempo final indicó que el hongo *Aspergillus sp.* fue notablemente predominante en ambas columnas). En paralelo se realizaron observaciones del soporte en el microscopio electrónico. Las microfotografías se presentan en las figuras 4.28 y 4.29 y en ellas se puede apreciar que a ese tiempo aún había levadura *P. methanolica*, incluso gemando, y que la presencia fúngica era intensa.

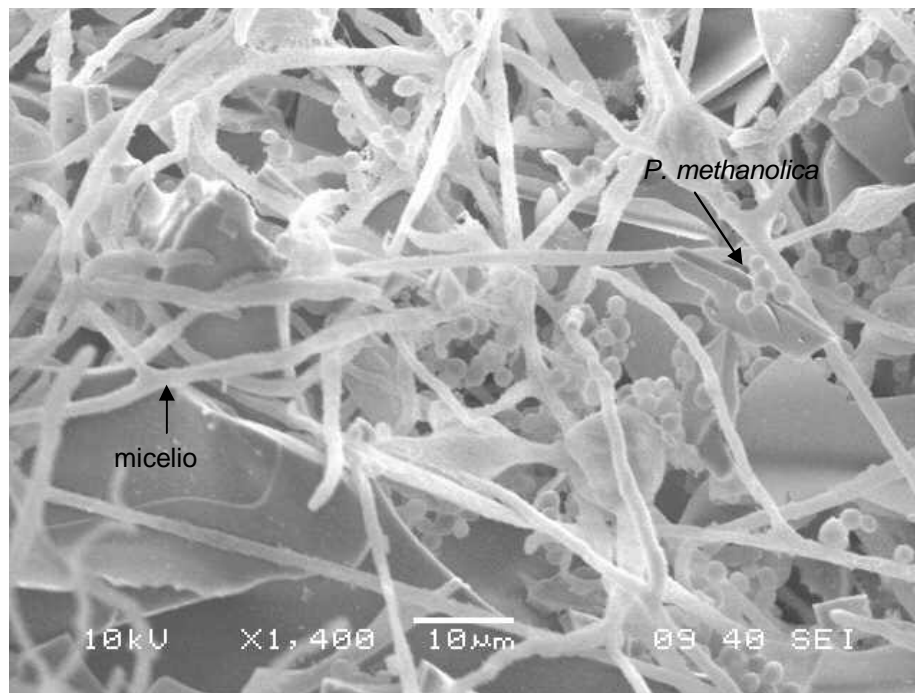


Fig. 4.28. Microfotografía de *P. methanolica* y hongo contaminante sobre perlita (día 18).

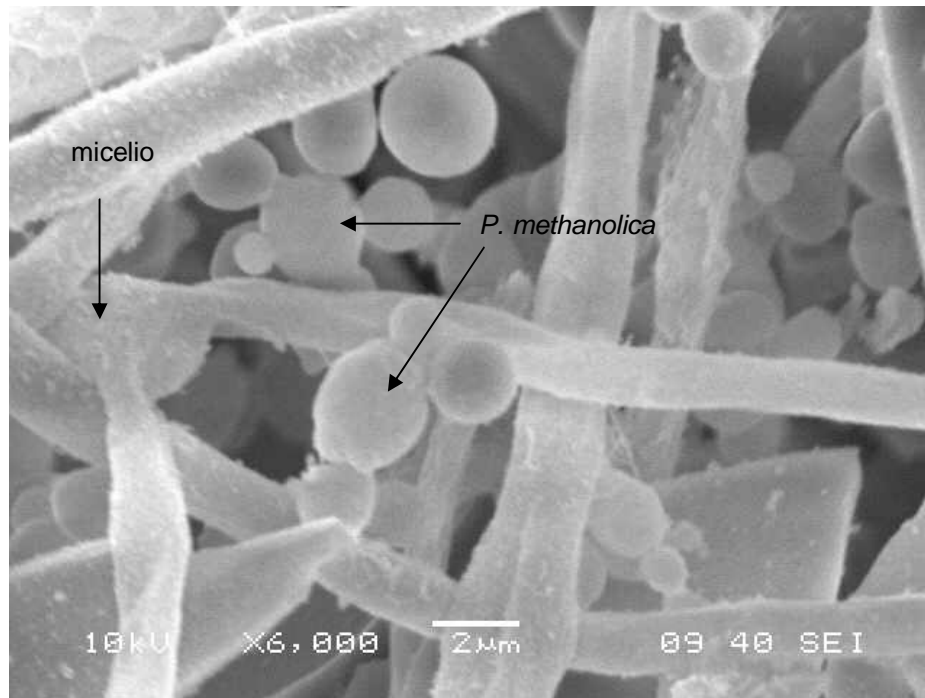


Fig. 4.29 Microfotografía de *P. methanolica* y hongo contaminante sobre perlita (día 18).

Puesto que la CE alcanzada con el hongo *Aspergillus sp.* ( $235 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ ) se encuentra en el límite superior de lo ya reportado, resulta interesante considerarlo como un microorganismo alternativo para un proceso de biofiltración del metanol. Además, el empleo de hongos en este tipo de procesos tiene la ventaja, respecto a los consorcios bacterianos, de que pueden soportar humedades y pH's bajos.



---

## 5. CONCLUSIONES.

Se estudió el proceso de biofiltración de metanol empleando un cultivo puro de *P. methanolica* basándose en datos de su crecimiento en medio líquido.

En microcosmos, se determinó que el valor de la velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ) fue de  $0.066 \text{ g}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$  y el coeficiente de mantenimiento de  $23.8 \text{ mg}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$ . El valor del coeficiente de mantenimiento es significativo en comparación con  $q_s$ , indicando la capacidad de la levadura de continuar consumiendo metanol aún cuando exista limitación de sales minerales, lo cual ocurre frecuentemente en biofiltración. Con base en  $q_s$  y la biomasa máxima alcanzada en biofiltro ( $32.2 \text{ mg}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$ ) se estimó una capacidad de eliminación (CE) de  $220 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$  y experimentalmente se obtuvo una  $CE_{\text{máx}}$  de  $190 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$ .

Se demostró que en medio líquido, el consumo de oxígeno se favorece a concentraciones de metanol entre 100 – 400 mmol/L y continúa a una concentración de 1530 mmol/L nivel al que, aparentemente, sólo hay una baja inhibición. En biofiltración, fue posible emplear concentraciones de metanol de hasta  $8.7 \text{ g}/\text{m}^3$  (lo que corresponde a una concentración de 314 mmol/L en la fase líquido + soporte) sin problemas de inhibición.

El soporte empleado influyó en el comportamiento del biofiltro. Así, con perlita se obtuvo una  $CE_{\text{máx}}$  de  $190 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$  y una biomasa de  $32.2 \text{ mg}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$  lo cual indica que se consumió  $56.5 \text{ mg}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$ . Análogamente para el bagazo de caña se alcanzó una  $CE_{\text{máx}}$  de  $158 \text{ g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$ , una biomasa de  $24.2 \text{ mg}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$  y un consumo  $74.2 \text{ mg}_{\text{metanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$ . Es decir, la biomasa presente en el bagazo de caña fue biológicamente más activa que la de perlita pero, la perlita favoreció la generación de biomasa.

El pH en el biofiltro, inicialmente de 5.0, disminuyó rápidamente para estabilizarse en un pH de 2.7. Este factor limitó la contaminación bacteriana pero no la fúngica la cual apareció ocasionalmente debido al empleo de aire no estéril o a las intervenciones a las columnas. Aunque el empleo de un cultivo puro especializado en el consumo de metanol permitió alcanzar capacidades de eliminación altas ( $190 \text{ g/m}^3\cdot\text{h}$ ), evitar la contaminación del biofiltro fue difícil. Por ello, se recomienda, para este proceso, esterilizar el aire.

Se presentó secado en el biofiltro debido a una incompleta saturación de humedad del aire de alimentación. La estrategia más efectiva para restablecer la humedad del biofiltro fue adicionar agua sin mezclado. La adición de medio mineral, además de revertir el secado fomentó la generación de biomasa.

La presencia del hongo *Aspergillus sp.* en el biofiltro (el cual contaminó una columna y finalmente se volvió predominante) favoreció el consumo de metanol alcanzándose una  $CE_{\text{máx}}$  de  $235 \text{ g/m}^3\cdot\text{h}$ . Así, este microorganismo representa una opción atractiva para la eliminación del metanol con la ventaja de que los hongos son más tolerantes a las condiciones de secado.

---

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- § Acuña M., Pérez F., Auria R., Revah S. Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnology and Bioengineering*. 63: 175-184 (1999).
- § Adler F. Stephen. *Biofiltration- A primer*. Environmental Protection. April 2001  
<http://www.aiche.org/cep/>
- § Allais J.J., Louktubi A., Baratti. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the formate deshydrogenase. *J.,Agric. Biol. Chem.* 47: 2547-2554 (1983).
- § Arulneyam D., Swaminathan T., Biodegradation of methanol vapor in a biofilter. *Journal of Environmental Sciences*. 15: 691-696. (2003).
- § Ashin V., Trotsenko Y. Alcohol oxidase of the methylotrophic yeasts: new findings. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10: 295-303 (2000).
- § Atkinson B., Mavituna F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. 2<sup>a</sup> ed. Edit. Stockton Press. Canada (1991)
- § Auria R., Aycaguer A., Deviny S. J. Influence of water content on degradation rates for ethanol in biofiltration. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 48: 65-70 (1998).
- § Auria R., Frere G., Morales M., Acuña M. E., Revah S. Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*. 68: 448-455 (2000).
- § Bailey E. James, Ollis F. David. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2<sup>a</sup> ed. Edit. Mc. Graw-Hill. (1986)
- § Cárdenas G. B., Revah M. S., Hernández J. S., Martínez S. A., Gutierrez A. V. Tratamiento biológico de compuestos orgánicos volátiles de fuentes fijas.

- 
- Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT) México (2003)  
<http://www.ine.gob.mx>
- § Cereghino L. J., Cregg M. J. Heterologous protein expression en the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews. 24: 45-66 (2000).
- § Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte (CEC). (1998).  
<http://www.cec.org>
- § Cooper C. D., Alley F.C. Air Pollution Control. A Design Approach. 2a ed. Edit. Waveland Press, Inc. U.S.A. (1994).
- § Cornabé T., Auria R., Christen P., Ferrer H., Revah S., and Moukha S. Biofiltration of methanol vapors by a recombinant *Pichia pastoris* strain. 5<sup>th</sup> International Conference. 2002 USC-TRG Conference on Biofiltration. USA. (2002).
- § Cox H. H. J., Magielsen F. J., Doddema H. J., Harder W. Influence of the water content and water activity on styrene degradation by *Exophiala jeanselmei* in biofilters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 851-856 (1996).
- § Cox H.H.J., Moerman R.E., van Baalen S., van Heiningen W. N. M., Doddema H.J., Harder W. Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. Biotechnology and Bioengineering 53: 259–266 (1997)
- § Christen P., Domenech F., Michelena G., Auria R., Revah S. Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. Journal of Hazardous Materials B89 253-265 (2002).
- § d'Anjou. C.M., Daugulis J.A. A model-based feeding strategy for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnology Techniques. 865-868. (1997)

- 
- § d'Anjou C.M., Daugulis J.A. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 72: 1-11 (2001).
- § Deshusses A. Marc, Camdon T. Johnson. Development and validation of a simple protocol to rapidly determine the performance of biofilters for VOC treatment. *Environmental Science & Technology*. 38. 461-467 (2000)
- § Devigny S. J., Deshusses A. M., Webster S. T. *Biofiltration for air pollution control*. Edit. Lewis Publishers. (1999).
- § Dueso Nadine. *Volatile Organic Compounds Treatment Techniques* Vigneron S., Hermia J., Chaouki J. Eds. *Characterization and control of odours and VOC in the process industries. Proceedings on the second international symposium on characterization and control of odours and VOC in the process industries. Louvain-la-Neuve Belgica. 3-5 noviembre 1993*. Edit. Elsevier. (1994)
- § Duff J.B.S., Murray D.W. Production and application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 44-49 (1988).
- § Environmental Protection Agency (EPA). <http://www.epa.gov>
- § Ergas J. S. Conferencia: Biological air pollution control using biofilters and HFMBs. México (2003).
- § Faber K. N., Harder W., Ab G., Veenhuis M. Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11: 1331-1344. (1995).
- § García-Peña E. I., Hernández S., Favela-Torres E., Auria R., Revah S. Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnology and Bioengineering*. 76: 61-69 (2001).
- § Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741-750 (2000).

- 
- § van Groenestijn J. W., Hesselink P. Biotechniques for air pollution control. Biodegradation 4: 283-301 (1993).
- § Hoja de seguridad del metanol (2002)  
<http://www.fquim.unam.mx/html/portales/Seguridad/hojas>.
- § de Hoop M. J., Cregg J., Keizer-Gunnink I., Sjollem Klaas, Veenhuis M., Ab G. Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. FEBS Letters. 291: 299-302. (1991)
- § Invitrogen. A manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia methanolica*. Invitrogen™ life technologies (2003) <http://www.invitrogen.com>
- § Kennes C., Thalasso F. Waste gas biotreatment technology. J. Chem. Technol. Biotechnol. 72: 303-319 (1998).
- § Klaus W. Nonconventional yeasts in biotechnology. A handbook. Edit. Springer. (1996).
- § Kong Z., Farhana L., Fulthorpe R.R., Allen D.G. Treatment of volatile organic compounds in a biotrickling filter under thermophilic conditions. Environmental Science & Technology 35: 4347-4352 (2001).
- § Krailas S., Tuan Pham Q., Amal R. Jiang J.K., Heitz M. Effect of inlet mass loading, water and total bacteria count on methanol elimination using upward flow and downward flow biofilters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 75: 299-305 (2000).
- § Lee C.C. Shun Dar Lin. Handbook of environmental engineering calculations. Edit. Mc Graw-Hill U.S.A (2000).
- § Leson G., Winer M. A. Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. Journal of the Air & Waste Management Association. 41: 1045-1054 (1991).

- 
- § Leson G., Chavira R., Winer A., Hodge D. Experiences with a full-scale biofilter for control of ethanol emissions. En 88<sup>th</sup> Annual Meeting & Exhibition. Texas USA 2-11 (1995).
- § Magaña R. M. Tesis: degradación de metil terbutil eter (MTBE): Aspectos cinéticos y de condiciones de co-metabolismo. UAM México (2001).
- § Maier M. R., Pepper L. I., Gerba P. C. Environmental Microbiology. Academic Press. U.S.A (2000)
- § Manual de Instrucciones. YSI modelo 5300, Monitor de oxígeno biológico. YSI Incorporated. Yellow Springs Instruments Co., Inc.
- § Mayson E. B., Kilburn G. D., Zamost L. B., Raymond K. C. K. Raymond, Lesnicki J. G. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. Biotechnology and Bioengineering 81: 291-298. (2003).
- § Molina T. L., Molina J. M. Air quality in the Mexico megacity. Edit. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands (2002).
- § Morales M., Hernández S., Cornabé T., Revah S., Auria R. Effect of drying on biofilter performance: modeling and experimental approach. Environmental Science & Technology. 37: 985-992 (2003).
- § Mohseni M., Grant A. D. Transient performance of biofilters treating mixtures of hydrophilic and hydrophobic volatile organic compounds. Journal of the Air & Waste Management Association. 49: 1434-1441 (1999).
- § Mohseni M., Grant A. D. Biofiltration of mixtures of hydrophilic and hydrophobic volatile organic compounds. Chemical Engineering Science 55: 1545-1558 (2000).

- 
- § Ottengraf P. P. S. van den Oever H. C. A. Kinetics of organic compound removal from waste gases with a biological filter. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 3089-3102 (1983).
- § Ottengraf P.P.S Exhaust gas purification. Rehm H. S. & Reed G. Eds. *Biotechnology*. Vol. 8 VCH Verlagsgesellsch. Weinheim 425- 452. (1986)
- § Pollution Engineering. Nature's Own. 2002 <http://www.pollutionengineering.com>
- § Prado O. J., Mendoza J. A., Veiga M. C., Kennes C. Optimization of nutrient supply in a downflow gas-phase biofilter packed with an inert carrier. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 567-573 (2002)
- § Rafson J. Harold. *Odor and VOC control Handbook*. Edit. Mc-Graw Hill. (1998).
- § Rose H. A., Harrison S. J. *The Yeasts*. Vol. 1 *Biology of Yeasts*. Edit. Academic Press. Inglaterra (1974).
- § Schwedt, G. *The essential guide to environmental chemistry*. Edit. John Wiley & Sons, LTD. U.K (2001).
- § SEMARNAT, Secretaría de Ecología, Secretaría de Salud. Programa para mejorar la calidad del aire de la zona metropolitana del valle de México 2002-2010 (PROAIRE 2002-2010). México.
- § SEMARNAT: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Informe de la situación del medio ambiente. México (2002). <http://www.semarnat.gob.mx>
- § Sell J. Nancy. *Industrial pollution control: issues and techniques*. 2a. ed. Edit. Van Nostrand Reinhold. New York (1992).
- § Shareefdeen Z., Baltzis C.B., Young-Sook O., Bartha R. Biofiltration of methanol vapor. *Biotechnology and Bioengineering* 41: 512-524. (1993).
- § Sologar V. S., Lu Z. J., Allen D. G. Biofiltration of concentrated mixtures of hydrogen sulfide and methanol. *Environmental Progress* 22: 129-136. (2003).



- 
- § Swanson J. W., Loehr C. R. Biofiltration: fundamentals, design and operations principles, and applications. *Journal of Environmental Engineering*. 538-546 (1997)
- § Thalasso F., Omil F., Otero O., Lema J.M. Treatment of volatile organic compounds in a dry tubular biofilm reactor using tubular carrier. *Proceedings. Waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries*. Yucatán (1999)
- § Trinh L.B., Phue J.N., Shiloach J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. 82: 438-444 (2003).
- § The Difco Manual, 11<sup>a</sup>ed., 2002 <http://www.bd.com/industrial/difco/manual.asp>
- § Wang J.C.D., Cooney L.C., Demain L A., Dunnill P., Humphrey E. A., Lilly D. M. *Fermentation and enzyme technology*. Edit. John Wiley & Sons. U.S.A (1979)
- § Woodward R. J. Methylootropic organisms and their uses: an update. *Enzyme Microbiology Technology* 11: 457-461 (1989).
- § Yang H., Minuth B., Grant A. D. Effects of nitrogen and oxygen on biofilter performance. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 52: 279-286 (2002).
- § Yaws Carl, Yang Haur-Chung, Pan Xiang. Organic Compounds in Water. *Chemical Engineering*. 179-185. November 1991
- § Zhang W., Bevins A. M., Plantz A. B., Smith A. L., Meagher M. M. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering* 70: 1-8 (2000)

## 7. ANEXOS

### 7.1 TECNICA DE OXIMETRIA.

Esta técnica permite medir el consumo de oxígeno en medio líquido, por un sistema biológico que en este caso fue la levadura *P. methanolica*

Los componentes del equipo de oximetría son:

- a. Una cámara, de 1.5 mL, en donde se coloca la muestra líquida, biológicamente activa.
- b. Un electrodo de Clark que permite medir oxígeno disuelto.
- c. Un baño para controlar la temperatura del sistema.
- d. Un sistema de agitación.
- e. Una computadora, a la cual está conectado el electrodo, que registra la evolución del oxígeno en el sistema.

Previo a la determinación de consumo de oxígeno por la levadura se calibra el equipo.

Para ello:

- 1.- Se burbujea aire en agua destilada durante 30 min. para saturarla de oxígeno.
- 2.- Se establecen y aseguran las conexiones del baño de temperatura constante empleado agua destilada. La temperatura de trabajo es de 30°C.
- 3.- Se hace el cambio de la membrana del electrodo. El proceso consiste en: a) lavar el electrodo perfectamente con agua destilada y secarlo, b) poner una gota de la solución electrolito de KCl (evitando la formación de burbujas) y c) colocar la membrana nueva.
- 4.- Se activa la agitación.
- 5.- Empleando el agua saturada de oxígeno del paso 1, se calibra el equipo a 100%. Es importante recordar que el volumen de trabajo es de 1.5 mL el cual se debe respetar siempre.

Para determinar el consumo de oxígeno por *P. methanolica*:

1.- En la computadora. Se trabajó en un programa llamado Biocrom, que captura la evolución del oxígeno en el sistema. En él se fijan parámetros tales como nombre, tiempo de la corrida y frecuencia de la adquisición de datos.

2.- Poner los componentes del sistema que se va a analizar recordando que el volumen total es de 1.5 mL. Las soluciones y el orden en que se adicionan son:

- El amortiguador de fosfatos del pH de interés. Este se debe airear previamente, igual que el agua en el paso 1.
- Sales YNB.
- Metanol.
- La levadura *P. methanolica*.

Inmediatamente después de adicionar la biomasa se debe activar la captura de resultados.

La concentración de la biomasa empleada debe ser cuantificada para poder referir el consumo de oxígeno por gramo de biomasa.

Es importante realizar una corrida inicial sin sustrato para conocer la respiración endógena de la biomasa.

3.- Entre una corrida y otra se lava la cámara con agua destilada.

4.- Al final del experimento los datos se recuperan y se trabaja con ellos en Microsoft® Excel 2000. Los datos originalmente están expresados en % de oxígeno x 10 vs. tiempo (minutos). Así para expresar los datos en % se deben dividir entre 10.

Cabe mencionar que en una serie de experimentos se detectó que, antes de adicionar la biomasa, una vez adicionado el metanol, se presenta un fenómeno de aparente consumo de oxígeno. Si este comportamiento se ignora, altera el valor real de la velocidad de consumo de oxígeno por *P. methanolica*. Se hicieron varias corridas de 20-25 min. para ver, de manera abiótica, este comportamiento a diferentes concentraciones de metanol.

En la figura 7.1 se presenta el resultado durante los primeros 7 minutos después de los cuales el % de oxígeno se mantenía constante.

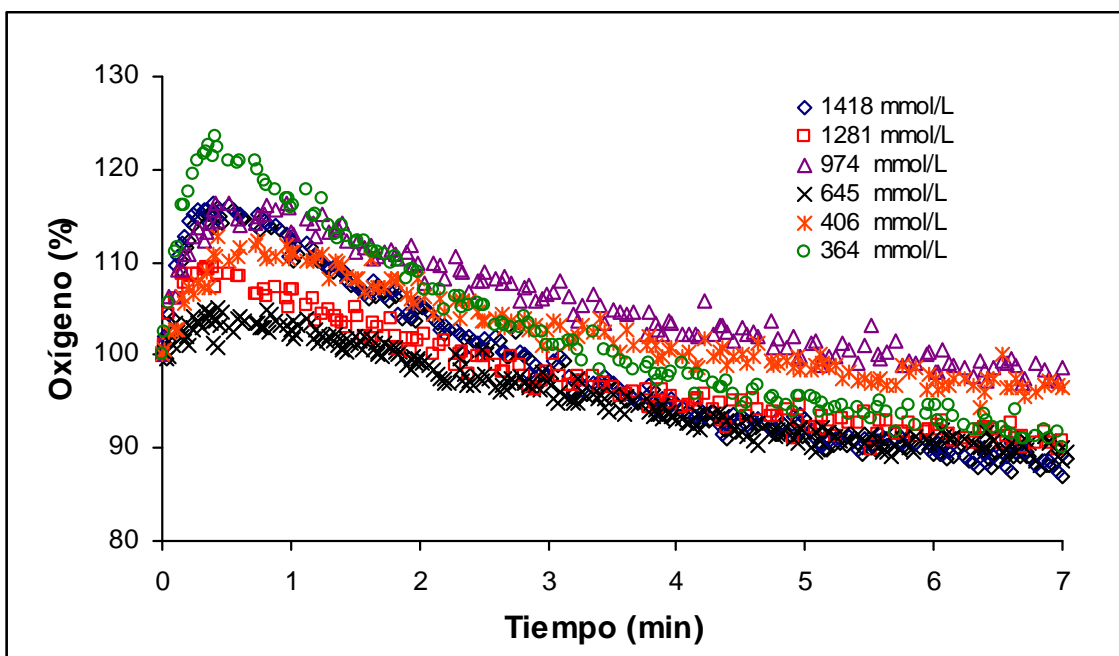


Fig. 7.1 Efecto del metanol en la solubilidad del oxígeno.

Como se observa en la figura 7.1, cuando se adiciona el metanol en el sistema experimental, se incrementa el % del oxígeno hasta un 23% durante los primeros 30 segundos. Después el % de oxígeno disminuye durante los siguientes minutos hasta alcanzar valores entre 90 a 98%. No se observa una relación entre la concentración de metanol y el tiempo necesario para que el % de oxígeno se estabilice.

Considerando que una posible razón de tal fenómeno era que había oxígeno atrapado en el metanol, se probó burbujear nitrógeno en las soluciones evaluadas para desplazar el oxígeno. Sin embargo, la respuesta fue la misma.

Esto parece indicar que al ser el metanol un compuesto hidrofílico, su adición al sistema hace que exista menos agua disponible para solubilizar el oxígeno presentándose un fenómeno similar al "salting out" en la precipitación de compuestos biológicos como proteínas.

Para efectos prácticos, en la determinación del consumo de oxígeno por la levadura, primero se ponía el buffer, las sales YNB y el metanol. Se permitía que el sistema se estabilizara, normalmente entre 5 a 10 minutos, y después se adicionaba la biomasa. Fig.

7.2

### Manejo de los datos.

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos están expresados en O/00 de oxígeno (% de oxígeno x 10 que es la escala del oxímetro) vs. tiempo (minutos). Dividiendo los valores reportados de oxígeno entre 10 se obtiene oxígeno (%) vs. tiempo (min). Estos datos a su vez se transforman a oxígeno ( $\mu\text{mol/L}$ ) vs. tiempo (min.) considerando que, a nivel de la ciudad de México, 100% de oxígeno corresponde a  $178.25 \mu\text{mol/L}$ . El consumo de oxígeno se evaluó considerando  $\mu\text{mol O}_2/\text{L}_{\text{consumido}} = \mu\text{mol O}_2/\text{L}_{\text{inicial}} - \mu\text{mol O}_2/\text{L}_{\text{al tiempo } t}$  (fig. 7.3).

Aquellos datos así manejados y obtenidos a partir de la adición de biomasa, se ajustaron al modelo de Gompertz empleando el programa Microcal™ Origin® Versión 6.0.

Los datos se ajustaron al modelo obteniendo valores de  $R^2$  superiores a 0.99

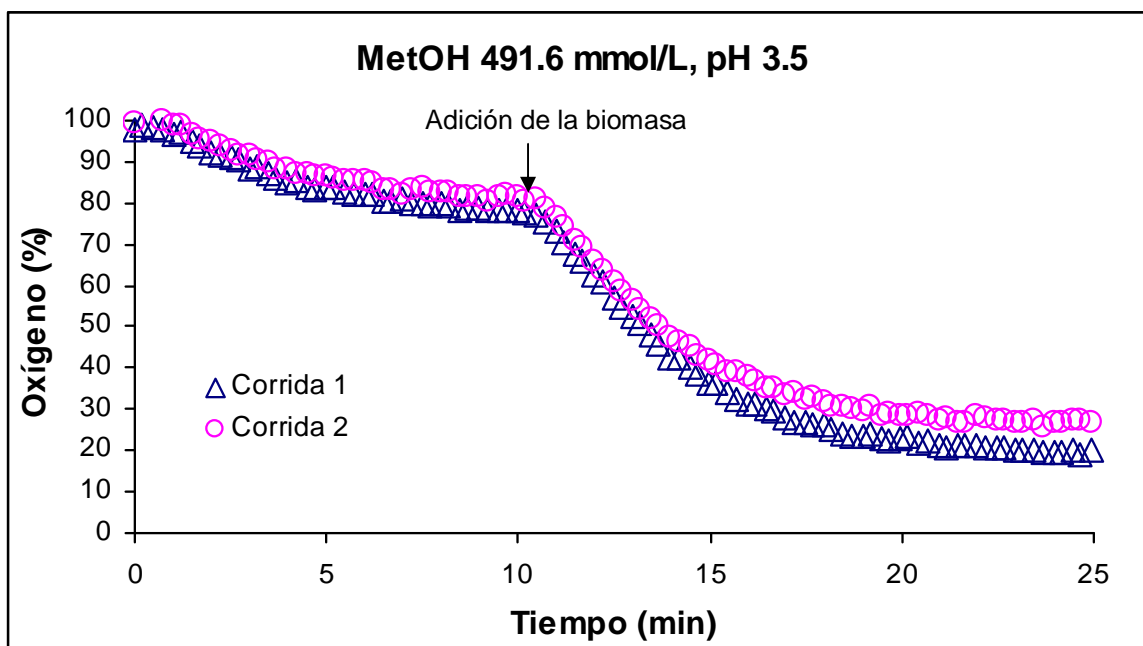


Fig. 7.2. Consumo de oxígeno por *P. methanolica*.

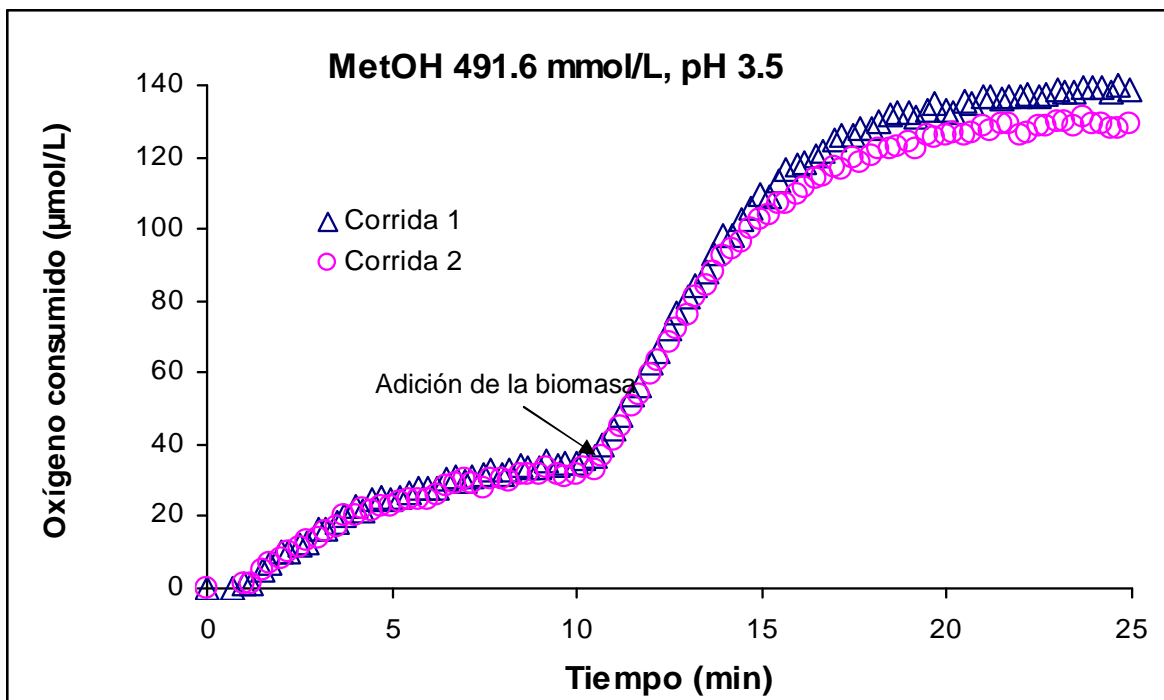


Fig. 7.3. Consumo de oxígeno por *P. methanolica*.

Finalmente, a la velocidad de consumo de oxígeno se le resta el valor de la respiración endógena de la levadura para determinar el efecto del factor que se evaluó. La velocidad de consumo de oxígeno se referencia a la cantidad de biomasa empleada para así obtener la velocidad específica de consumo de oxígeno.

## 7.2 MODELO DE GOMPERTZ.

El modelo de Gompertz es una función asintótica ampliamente empleada en el modelamiento del crecimiento de plantas y bacterias (Magaña, 2001). Además, puede emplearse para modelar el consumo de un sustrato, en este caso, metanol u oxígeno (Acuña *et. al.*, 1999).

La ecuación que describe a esta función es:

$$S_c = \alpha \cdot \exp^{(-\beta \cdot \exp^{-kt})} \quad (\text{ec. 7.1})$$

donde  $S_c$ : sustrato consumido (g/L).

$\alpha$ : Concentración máxima de sustrato consumido (g/L) [cuando  $t \rightarrow \infty$  este término es igual a la concentración inicial de sustrato].

$\beta$ : parámetro relacionado con las condiciones iniciales (adimensional) [cuando  $t=0$   $S_c = \alpha \exp(-\beta)$ ].

$k$ : velocidad de consumo de sustrato ( $h^{-1}$ )

$t$ : tiempo (h).

Haciendo un análisis de la función se tiene que (Magaña, 2001):

Al derivar la ec. 7.1 respecto al tiempo  $\frac{dS_c}{dt} = \alpha \cdot \frac{d \exp(-\beta \cdot \exp^{-kt})}{dt}$  se obtiene la velocidad de consumo del sustrato en función del tiempo:

$$\frac{dS_c}{dt} = \alpha \cdot \beta \cdot k \cdot \exp(-\beta \exp^{-kt}) \exp^{-kt} \quad (\text{ec. 7.2})$$

Al igualar la ec. 7.2 a cero se obtiene un punto crítico ( $c$ ) definido como:

$$c = \frac{\ln(1/\beta)}{-k}$$

Para determinar si el punto crítico corresponde a un máximo o un mínimo es necesario obtener segunda derivada de la ecuación de Gompertz. Resolviendo para la segunda derivada se obtiene:

$$\frac{d^2 S_c}{dt^2} = \exp(-\beta \exp^{-kt}) (\alpha \cdot \beta \cdot k \cdot \exp^{-kt}) (\beta \cdot k \exp^{-kt} - k) \quad (\text{ec 7.3})$$

Evaluando el punto crítico en la ec. 7.3 se determina que el valor crítico es un máximo ya que  $f''(c) < 0$ .

Al evaluar el punto crítico en la primera derivada, para obtener la velocidad máxima de consumo del sustrato ( $V_{\text{máx}}$ ), se obtiene (Magaña, 2001):

$$V_{\text{max}} = \alpha \cdot k \cdot \exp(-1) = \alpha \cdot k \cdot 0.368$$

### 7.3 CURVA PATRON DE METANOL.

Se realizaron curvas patrón del metanol en fase gaseosa y líquida y se estuvo corroborando su validez cada 3 meses.

#### Fase Gaseosa.

Se emplea un bulbo de vidrio hermético de 0.5L al cual se le adiciona sucesivamente metanol líquido para obtener, después de la volatilización del metanol, concentraciones de 5,10,15,20 y 30  $\mu\text{L/L}$ . Después de la adición de metanol al bulbo, este se pone en una incubadora a 30°C por espacio de 60 minutos. Con una jeringa de gases de 1 mL (Hamilton, Australia) se toma una muestra de 250  $\mu\text{L}$  la cual se inyecta en el cromatógrafo de gases. El muestreo es por duplicado.

Los resultados se grafican, concentración de metanol  $\mu\text{L/L}$  vs. área, y se hace una regresión lineal de los datos (Fig. 7.4).

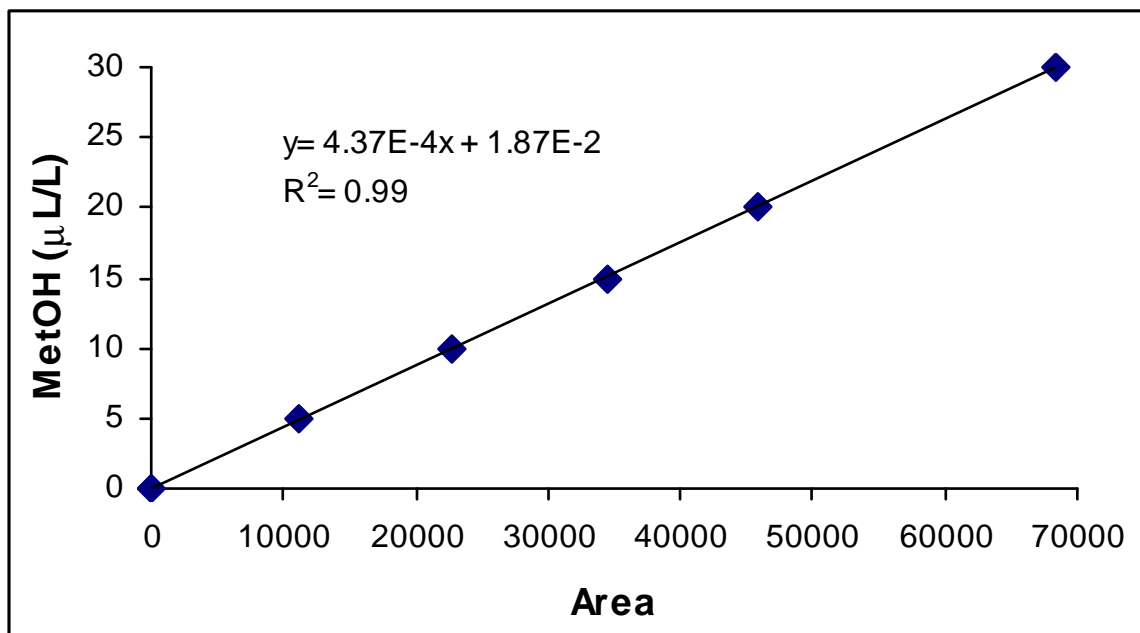


Fig.7.4 Curva patrón de metanol en fase gaseosa.

#### Fase líquida.

Para cuantificar el metanol en la fase líquida se emplea isopropanol como estándar interno a una concentración de 196.2 mmol/L. Además se preparan soluciones de metanol



de 122.9, 245.8, 368.7, 491.6, 737.4, 983.2 mmol/L. Ambas soluciones se mezclan, en proporción 1:1 y se mantienen en frío para evitar evaporación de los alcoholes.

Con una jeringa se líquidos se toman muestras de 0.1 – 0.2  $\mu\text{L}$  para inyectar en el cromatógrafo de gases.

Los datos se grafican, concentración de metanol (mmol/L) vs área metanol / área isopropanol y se hace una regresión lineal de ellos (Fig. 7.5)

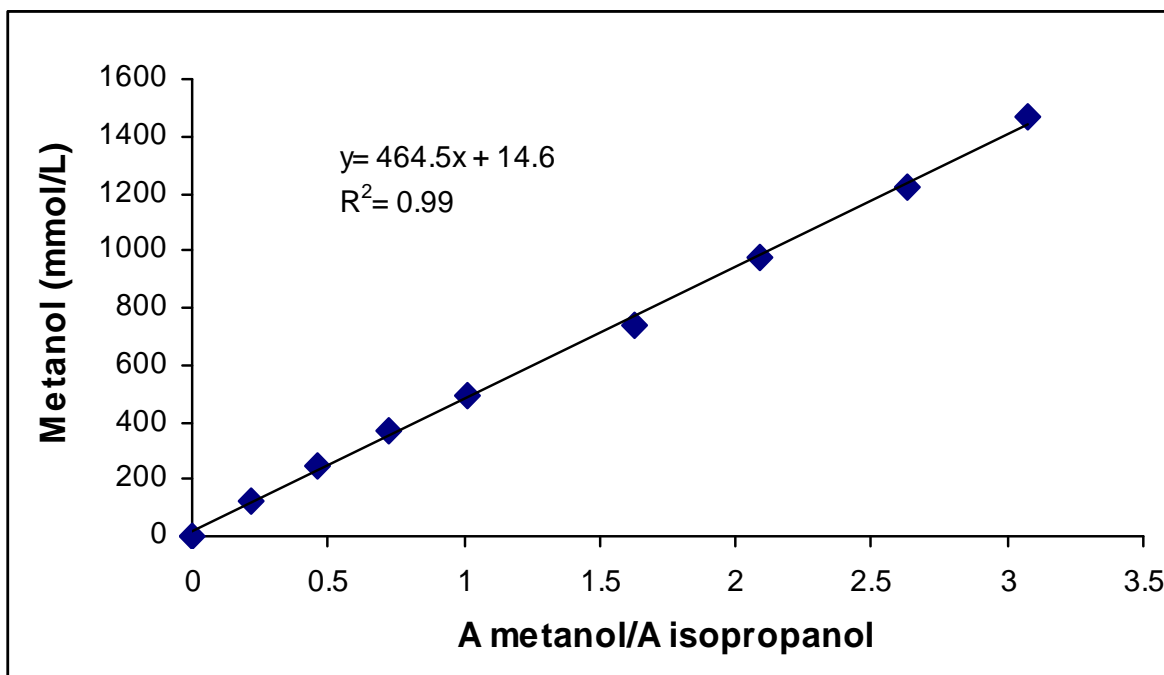


Fig.7.5 Curva patrón de metanol en fase líquida.

#### 7.4 FACTORES DE CONVERSION Y CURVA PATRON DE CO<sub>2</sub>.

Como se mencionó en la sección 3.9.3, en los experimentos en medio líquido se trabajó en un cromatógrafo de gases Gow-Mac. Para transformar los datos de área proporcionados por este cromatógrafo en % de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se requiere primero determinar factores de conversión (F). Para determinar estos factores es necesario contar con una muestra de un gas de composición conocida (estándar) que en este caso fue: CO<sub>2</sub>, 9.98%; O<sub>2</sub>, 21% y N<sub>2</sub>, 69.02% (el N<sub>2</sub> funciona como estándar interno) 250  $\mu\text{L}$  del estándar

se inyectan al cromatógrafo y las áreas reportadas por el equipo junto con los datos de composición del estándar se sustituyen en las ecuaciones 7.4, 7.5 y 7.6.

$$F_{\frac{\text{CO}_2}{\text{N}_2}} = \left( \frac{\% \text{CO}_2}{\% \text{O}_2} \right) \left( \frac{\text{Area} \cdot \text{N}_2}{\text{Area} \cdot \text{CO}_2} \right) \left( \frac{\text{Area} \cdot \text{aire}}{\text{Area} \cdot \text{N}_2 + \text{Area} \cdot \text{O}_2} \right) \quad \dots(\text{ec. 7.4})$$

$$F_{\text{CO}_2} = \left( F_{\frac{\text{CO}_2}{\text{N}_2}} \right) (\% \text{N}_2) \quad \dots(\text{ec. 7.5})$$

$$F_{\text{O}_2} = (\% \text{N}_2) \left( F_{\frac{\text{O}_2}{\text{N}_2}} \right) = \left( \frac{\% \text{O}_2}{\frac{\text{Area} \cdot \text{O}_2}{\text{Area} \cdot \text{N}_2}} \right) \quad \dots(\text{ec 7.6})$$

Realizando este procedimiento se obtuvo que  $F_{\text{CO}_2} = 69.24$  y  $F_{\text{O}_2} = 73.98$ .

Con estos valores se obtenía el % de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  mediante las fórmulas:

$$\% \text{CO}_2 = \left( \frac{\text{Area} \cdot \text{CO}_2}{\text{Area} \cdot \text{N}_2} \right) \left( \frac{\text{Area} \cdot \text{N}_2 + \text{Area} \cdot \text{O}_2}{\text{Area}_{\text{aire}}} \right) F_{\text{CO}_2} \quad (\text{ec. 7.7})$$

$$\% \text{O}_2 = \left( \frac{\text{Area} \cdot \text{O}_2}{\text{Area} \cdot \text{N}_2} \right) F_{\text{O}_2} \quad (\text{ec. 7.8})$$

El  $\text{CO}_2$  y el  $\text{O}_2$  se pueden expresar en gramos considerando la ecuación 7.9 y 7.10.

$$g\text{CO}_2 = \left( \frac{\text{Vol(L)} \times \text{P(atm)}}{\text{R} \left( \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \right) \times \text{T(K)}} \right) \left( \frac{\% \text{CO}_2}{100} \right) (\text{P.M.} \cdot \text{CO}_2) \quad (\text{ec. 7.9})$$

$$g\text{O}_2 = \left( \frac{\text{Vol(L)} \times \text{P(atm)}}{\text{R} \left( \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \right) \times \text{T(K)}} \right) \left( \frac{\% \text{O}_2}{100} \right) (\text{P.M.} \cdot \text{O}_2) \quad (\text{ec. 7.10})$$

Para los experimentos de biofiltración, se trabajó con el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (ver sección 3.9.3). En el se empleo una muestra de composición conocida como estándar la cual contenía  $1966 \mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$ ,  $1955 \mu\text{mol metano/mol}$ ,

balance en aire. Se inyectaron muestras gaseosas de 250  $\mu\text{L}$  y con estos datos se obtuvo un gráfico de  $\text{g CO}_2/\text{L}$  vs. área (se transforma el valor de  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$  en  $\text{g/L}$  empleando la ecuación de los gases ideales). Los datos graficados se ajustaron mediante una regresión lineal obteniéndose  $\text{g CO}_2/\text{L} = 1.94\text{E-}3 + 1.03\text{E-}6$  con  $R^2 = 0.99$ .