

10524  
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**"PLANTEAMIENTO TEORICO DEL DISEÑO  
DE UN BIOREACTOR A NIVEL PLANTA PILOTO,  
CONSIDERANDO COMO EJEMPLO, LA PRODUCCION  
DE ALFA AMILASA, A PARTIR DE *Bacillus licheniformis*"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO EN ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
ABEL CANDIA ARANDA

ASESORA: I.A. MA. GUADALUPE LOPEZ FRANCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO. 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Planteamiento teórico del diseño de un bioreactor a nivel planta piloto, considerando como ejemplo, la producción de alfa amilasa, a partir de Bacillus licheniformis"

que presenta el pasante: Abel Candia Aranda  
 con número de cuenta: 558341 para obtener el título de:  
 \* Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de noviembre de 2001

PRESIDENTE M en C. S. Patricia Miranda Castro

VOCAL I Q Oscar Germán Ibarra

SECRETARIO I A Ma Guadalupe López Franco

PRIMER SUPLENTE Dr. José Luis Arjona Román

SEGUNDO SUPLENTE en C. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza

2

**TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN**

## **Agradecimientos.**

Gracias, a la Ing. Ma. Guadalupe López Franco, por la dirección del presente trabajo.

Gracias, a la M. en C. S. Patricia Miranda Castro y al Ing. Gilberto Amaya por los comentarios en el presente trabajo.

Gracias al Dr. Enrique Galindo Fentanes Jefe del departamento de escalamiento y planta piloto del Instituto de Biotecnología UNAM por las facilidades otorgadas en la visita a las instalaciones del departamento al cual representa.

Gracias, al M. B. Martín Patiño Vera, Jefe de planta piloto del Instituto de Biotecnología por sus valiosas aportaciones en el presente trabajo.

Gracias, a los sinodales Ing. Oscar Germán Ibarra, Dr. José Luis Arjona Román y M. C. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza por las aportaciones al presente trabajo.

## ***Dedicatris***

Dedico el presente trabajo a:

**Dios**; por esa necesidad de agradecerle la vida y por cualquier fragmento de la misma.

**La vida**; por ofrecerme la generosidad de la evolución y el tiempo, de lo intangible y escondido, de lo interminable y lo alcanzable, de la totalidad y su unidad.

**Mis padres: Ignacio Candia Vidal y Antonia Aranda Salinas**; por ese ejemplo de humildad, sinceridad, entrega y fortaleza que cultivaron desde mi niñez.

A mis hermanas: **Laura, Ana y Ma. Guadalupe**; por su ejemplo de cohesión fraternal, a ellas por quien mi vida ofrecería.

A mis amigos y compañeros:

**María Elena** Pahuá Ramos, **Juan Armando** García de Sales, **Cristela, Obed** Ozorio, **Leonor** Matías y **Verónica** Mendoza, **Victor Manuel** Cruz y **Gabriel** Teutle: por ese sentido de responsabilidad y compañerismo.

A las familias:

**Rodríguez y Prospero** a quien tanto estimo y respeto, por ofrecerme ese calor de familia durante el tiempo de estudiante.

Con especial cariño a **Cynthia** Sánchez Hernández y Rodrigo Candia por el apoyo incondicional y por coexistir en este espacio y tiempo.

A la libertad, a esa disyuntiva que representa la convicción de **hacer todo o hacer nada**.

Abel Candia Aranda.

4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INDICE

	Pág.
1. Introducción. _____	1
2. Objetivos y justificación. _____	3
<b>CAPITULO I: ANTECEDENTES</b>	
3. Producción de $\alpha$ amilasa. _____	5
3.1 Generalidades. _____	5
3.2 Aplicación de la enzima $\alpha$ amilasa en el proceso de fabricación de jarabes. _____	7
3.3 Justificación para este trabajo, del uso del <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> como cepa productora de $\alpha$ amilasa. _____	13
3.4 Producción de $\alpha$ amilasa. _____	17
3.4.1 Etapas de preparación del inóculo. _____	17
3.4.2 Fermentación productiva. _____	19
3.4.2.1 Estados de crecimiento en los cuales se sintetiza la enzima. _____	20
3.4.3 Condiciones de fermentación. _____	20
4. Bioreactores. _____	24
4.1 Clasificación de los reactores biológicos. _____	24
4.2 Bioreactores de tanque agitado. _____	25
4.3 Bioreactor de columna de burbujas. _____	30
4.4 Bioreactor de tiro o corriente de aire. _____	31
4.5 Bioreactor de lecho empaquetado. _____	33

4.6 Bioreactor de lecho fluidizado.	33
4.7 Bioreactor de lecho por goteo.	34
4.8 Formas de operación de bioreactores.	36
4.8.1 Cultivo intermitente o batch.	38
4.8.2 Cultivo semi-continuo o fed batch.	41
4.8.2.1 Cultivo semibatch sin control feedback.	44
4.8.2.2 Cultivo semibatch con control feedback.	45
4.8.3 Cultivo continuo.	46
4.8.4 Comparación entre cultivo batch y continuo.	51

## **CAPITULO II: FENOMENOS DE TRANSPORTE**

5. Fenómenos de transporte en el proceso microbiano.	52
5.1 Justificación del tipo de bioreactor y modo de operación seleccionado.	53
5.2 Transferencia de materia gas líquido.	53
5.3 Factores que afectan la demanda de oxígeno celular.	54
5.4 Factores que afectan la transferencia de oxígeno en el medio de fermentación.	56
5.4.1 Transferencia de oxígeno desde las burbujas de gas a las células.	56
5.4.2 Efecto de los solutos.	59
5.4.3 Efecto de las burbujas.	59
5.4.4 Efecto de los agentes antiespumantes.	62
5.4.5 Efecto de la temperatura.	63

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

5.4.6 Efecto de la presión de gas y presión parcial del oxígeno.	63
5.5 Correlaciones para el cálculo del coeficiente de transferencia de materia.	64
5.5.1 Correlaciones de $k_L a$ para tanques agitados en sistemas no viscosos.	66
5.5.2 Correlaciones de $k_L a$ para tanques agitados en sistemas viscosos.	67
5.6 Mezclado y potencia de agitación.	68
5.6.1 Mezclado.	68
5.6.2 Potencia de agitación para fluidos newtonianos no aereados.	71
5.6.3 Potencia de agitación para fluidos newtonianos aereados.	76
5.6.4 Potencia de agitación para fluidos no newtonianos no aereados.	79
5.6.5 Potencia de agitación para fluidos no newtonianos aereados.	81
5.6.6 Inundación.	83
5.7 Criterios de escalamiento para biorreactores.	84
5.7.1 Escalas fermentativas.	86
5.7.2 Secuencia de cálculo para el escalamiento de bioreactores.	87

5.7.2.1 Metodología de escalamiento para bioreactores de tanque agitado, usando $k_{La}$ como criterio de escalamiento.	87
5.7.2.2 Algoritmo de programación (Programa "Scale up")	94
5.7.2.3 Resultados del cálculo de cambio de escala utilizando el programa "Scale up".	94

### **CAPITULO III: DISEÑO DEL BIOREACTOR**

6 Diseño del bioreactor (presentación del mismo de forma integrada en el proceso de producción de $\alpha$ amilasa).	113
6.1 Presentación y descripción del diagrama de flujo.	113
6.1.1 Preparación del medio de cultivo.	113
6.1.2 Preparación del inóculo de fermentación.	114
6.1.3 Adición de antiespumante y de sustancias reguladoras de pH.	114
6.1.4 Esterilización del medio de cultivo.	114
6.1.5 Fermentación.	115
6.1.6 Enfriamiento o calentamiento del medio de cultivo durante la fermentación.	115
6.1.7 Enfriamiento del caldo fermentado.	115
6.1.8 Floculación del caldo fermentado.	115
6.1.9 Centrifugación.	116
6.1.10 Ultrafiltración.	116

6.2	Revisión del código de construcción ASME	
	y selección de materiales de construcción.	116
6.2.1	Clasificación de los aceros inoxidables.	117
6.2.2	Cálculo del espesor de las paredes y	
	cabeza del bioreactor.	119
6.2.3	Resultados del cálculo del espesores de	
	las paredes y cabezas del bioreactor de acuerdo	
	a las recomendaciones del código ASME.	122
6.2.4	Accesorios del bioreactor.	123
	6.2.4.1 Accesorios de agitación y aireación.	124
6.3	Arreglos de tuberías.	129
6.4	Arreglos de los sellos mecánicos y sistemas	
	de agitación.	134
6.5	Arreglo del sistema de motoreducción para agitación.	136
7	Esterilización.	137
	7.1 Esterilización del medio de cultivo.	137
	7.2 Esterilización del bioreactor.	138
	7.3 Esterilización del aire de fermentación.	138
8	Instrumentación para el monitoreo y control de bioreactores.	140
	8.1 Control de los bioreactores.	140
	8.1.1 Sistemas de control.	142
	8.2 Instrumentación para el monitoreo del bioreactor.	145
	8.2.1 Medición de parámetros fisicoquímicos en línea.	145
	8.2.2 Medición de parámetros fisicoquímicos fuera de línea.	150

9	Servicios auxiliares.	153
9.1	Agua de proceso y de limpieza.	153
9.2	Agua enfriamiento.	153
9.3	Vapor de calentamiento.	154
9.4	Aire estéril comprimido.	154
9.5	Energía eléctrica.	154
10	Presentación gráfica de las instalaciones de la planta piloto que opera en el Instituto de Biotecnología UNAM.	155
11	Conclusiones.	165
12	Anexos.	167
	Anexo 1: Propiedades del medio de cultivo.	169
	Anexo 2: Cinética de las reacciones químicas y biológicas.	183
	Anexo 3: Rendimiento de producción y productividad.	202
	Anexo 4: Esterilización.	207
	Anexo 5: Instrumentación y control.	221
	Anexo 6: Servicios auxiliares.	233
	Anexo 7: Tablas relacionadas a especificaciones del código ASME.	237
	Anexo 8: Aislamiento y purificación de enzimas.	240
	Anexo 9: Presentación de algunos costos de materiales de construcción.	245
13	Referencias bibliográficas.	251

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## 1. INTRODUCCIÓN.

Dada la creciente demanda mundial de jarabes edulcorantes a partir de almidón de maíz, es conveniente optimizar el proceso industrial mediante el cual se preparan, con la finalidad de mejorar los rendimientos de producción. Una de las opciones para materializar este objetivo, consiste en llevar a cabo la hidrólisis del almidón a partir de enzimas ( $\alpha$  amilasa,  $\beta$  amilasa, amiloglucosidasas, etc.) en lugar de la tradicional hidrólisis ácida. Las enzimas son producto del desarrollo metabólico de bacterias, hongos, plantas y células animales, y su producción puede realizarse a nivel laboratorio o industrial, según sea la demanda de la misma. La enzima  $\alpha$  amilasa se produce ya sea por bacterias del género *Bacillus* o por hongos del género *Aspergillus* sp. Por propia conveniencia en el proceso de disrupción del almidón, el uso de  $\alpha$  amilasa termoestable sintetizada por bacterias de *Bacillus licheniformis* tiene la ventaja de acelerar la velocidad de reacción en comparación con la  $\alpha$  amilasa de otra fuente microbiana. El objetivo principal de este trabajo, es el de diseñar desde un punto de vista teórico un reactor biológico a escala piloto dentro del cual se encuentren las condiciones adecuadas de desarrollo celular del microorganismo *Bacillus licheniformis* y la formación de  $\alpha$  amilasa. El diseño estará sujeto al criterio de escalamiento  $k_L a$ , de donde se definirán las condiciones de operación para el diseño del bioreactor de escala industrial.

Para establecer las bases de diseño del bioreactor, el trabajo se dividirá en tres secciones las cuales son: antecedentes, fenómenos de transporte y diseño del bioreactor. En los antecedentes se abundará sobre las condiciones óptimas de producción de  $\alpha$  amilasa por el microorganismo y los estados de crecimiento en los cuales se sintetiza la enzima  $\alpha$  amilasa. En el capítulo de fenómenos de transporte se identificarán los criterios de diseño, realizando un análisis de los fenómenos de transporte, potencia de mezclado y se propondrá la metodología de escalamiento para bioreactores de tanque agitado mediante el coeficiente

volumétrico de transferencia de masa " $k_{L,a}$ ". La secuencia de cálculo para el cambio de escala laboratorio a escala piloto, se adaptará al lenguaje de programación Visual Basic con el fin de facilitar los cálculos correspondientes. En el capítulo de diseño del bioreactor se comenzara por situar el bioreactor en el proceso de fabricación de  $\alpha$  amilasa, seguido de una breve revisión del código ASME para el dimensionamiento de recipientes a presión y se identificarán los sistemas de monitoreo y control, así como los servicios auxiliares y la esterilización del medio de cultivo, equipo y aire de proceso. Finalmente se presentaran una serie de anexos que servirán de material de apoyo para la consulta del presente trabajo.

## 2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.

### OBJETIVO GENERAL.

Plantear el diseño de un sistema bioreactor a nivel piloto mediante bases teóricas, considerando como ejemplo la producción de  $\alpha$  amilasa a partir de *Bacillus licheniformis*.

#### Objetivo particular 1.

Seleccionar el tipo de bioreactor y el modo de operación en función de la cinética de formación de producto y crecimiento celular, para la producción de  $\alpha$  amilasa.

#### Objetivo particular 2

Elaborar un programa de computo que permita la simplificación de los cálculos inherentes al escalamiento del bioreactor usando  $k_L a$  como criterio de escalamiento.

#### Objetivo particular 3.

Determinar los servicios complementarios, así como el monitoreo adecuado de las principales variables y parámetros fisicoquímicos que aseguren el control global del bioreactor.

### JUSTIFICACIÓN.

Hoy en día, tanto el aporte de la Biotecnología como de la Ingeniería Genética, han generado avances significativos en lo que concierne al aumento de los rendimientos en la producción de alimentos. Un ejemplo de ello, es el empleo de cepas mutantes de *Bacillus licheniformis* altamente productoras de  $\alpha$  amilasa, las

cuales soportan elevadas concentraciones de glucosa sin riesgo de inhibición, incrementando así la producción de la enzima [57]. La producción de enzimas y su uso aplicado a procesos convencionales, podría reflejarse en un incremento en los rendimientos de un producto en particular dado a sus elevados grados de especificidad. El uso de enzimas termoestables ha propiciado obtener mejores resultados en la obtención de jarabes de glucosa, reduciendo así los costos de producción. [53]

# **CAPITULO I: ANTECEDENTES**

## **3. PRODUCCIÓN DE $\alpha$ AMILASA.**

### **3.1 Generalidades.**

La fermentación se define en términos generales, como la biotransformación de la materia orgánica. La fermentación es una reacción química que requiere de la presencia de nutrientes, microorganismos y/o materiales enzimáticos.

Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas de elevado peso molecular como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular.

Las enzimas se utilizan en cuatro campos bien diferenciados: como agentes terapéuticos, como herramientas para la manipulación de materiales biológicos (como genes por ejemplo), como reactivos analíticos y como catalizadores industriales.

La distribución del volumen de producción no refleja el reparto en cuanto al valor del mercado, y ocurre frecuentemente que los grandes productores se dedican a fabricar las enzimas de bajo costo y gran demanda, que se utilizan sobre todo como catalizadores industriales. Por el contrario, las pequeñas empresas suelen especializarse en la producción de cantidades pequeñas de enzimas de elevado costo, utilizadas principalmente en la actualidad en aplicaciones de manipulación o como instrumentos analíticos.

Las consideraciones de diseño propuestas en este trabajo, estarán enfocadas a la producción de la enzima alfa amilasa. Esta enzima se caracteriza por su poder amilolítico, por lo cual su uso está encaminado a:

1. La producción de jarabes que contienen glucosa, maltosa y oligosacáridos.
2. En la producción de azúcares fermentables en cervecería.
3. En la obtención de bebidas alcohólicas.
4. En la modificación de la harina de panadería.
5. Reducción de viscosidad de pastas.
6. Liquefacción de sopas y purés.

Su uso suele ser de forma libre y soluble, por lo que no se recupera para su reutilización, a menos que se disponga de un sistema inmovilizado que haga rentable el proceso. La enzima, se vende comúnmente en preparaciones líquidas, conservadas con 2% de cloruro de sodio. Las preparaciones líquidas más activas contienen 2% de enzimas activa, y las preparaciones sólidas más activas contienen 5%.

El principal uso de la enzima  $\alpha$  amilasa, se encuentra inmerso en la producción de jarabes de glucosa, jarabes de glucosa ricos en maltosa, dextrinas, maltodextrinas y jarabes de fructuosa. El último de ellos con crecientes demandas mundiales dado a su alto poder edulcorante. Cada uno de estos productos se fabrica para un aprovechamiento específico; por ejemplo las glucosas se aplican más a las industrias lácteas, de helados, de golosinas, botanas y otras. Mientras que el jarabe de glucosa, rico en maltosa encuentra su mayor demanda en la industria cervecera; la maltodextrina tiene una aplicación en la industria alimenticia como encapsulante de sabores, en alimentos para bebés, y como base para productos solubles.

Independientemente del tipo de jarabe que se obtenga a partir del almidón de maíz, trigo o de cualquier otro cereal y el tipo de uso, la enzima  $\alpha$  amilasa es necesaria para lograr la primera etapa de hidrólisis del almidón.

En México, la producción de jarabes, es muy poco usual, la gran mayoría de los productos de maíz, son importados, tal es el caso del jarabe de maíz rico en fructuosa, el cual solo es producido por empresas como ARANCIA-CPC y ALMEX-ADM, no obstante también incurriendo a la necesidad de importar, de acuerdo a la demanda local. [40,46] Cabe mencionar que el jarabe de maíz rico en fructuosa, representa el principal competidor de la sacarosa, comparados con sus costos de producción bajos; por tal motivo tiende a crecer la producción de este producto en el ámbito mundial.

### **3.2 Aplicación de la enzima $\alpha$ amilasa en el proceso de fabricación de jarabes.**

Como se ha mencionado, el uso de  $\alpha$  amilasa se encuentra inmerso en la producción de jarabes mediante la hidrólisis del almidón debido a la especificidad de la enzima. Una vez determinado el uso de la enzima, se pueden pensar en el tipo de fuentes que más convenga a los intereses del proceso en cuestión. Por tal razón, es que a continuación se resumen el proceso de producción de jarabes fructosados, con la finalidad de establecer el momento de su uso y de las condiciones de trabajo de la enzima.

La elaboración de jarabes a partir de almidón, puede llevarse a cabo de diferentes formas: mediante la hidrólisis ácida y por medios enzimáticos. Actualmente los sistemas enzimáticos son los que comúnmente se usan para reducir el almidón a sustancias de menor peso molecular (glucosa, maltosa, oligosacáridos). [24] En la fig. 3.1, se presenta el proceso generalizado para la producción de diferentes jarabes, a partir de almidón de maíz.

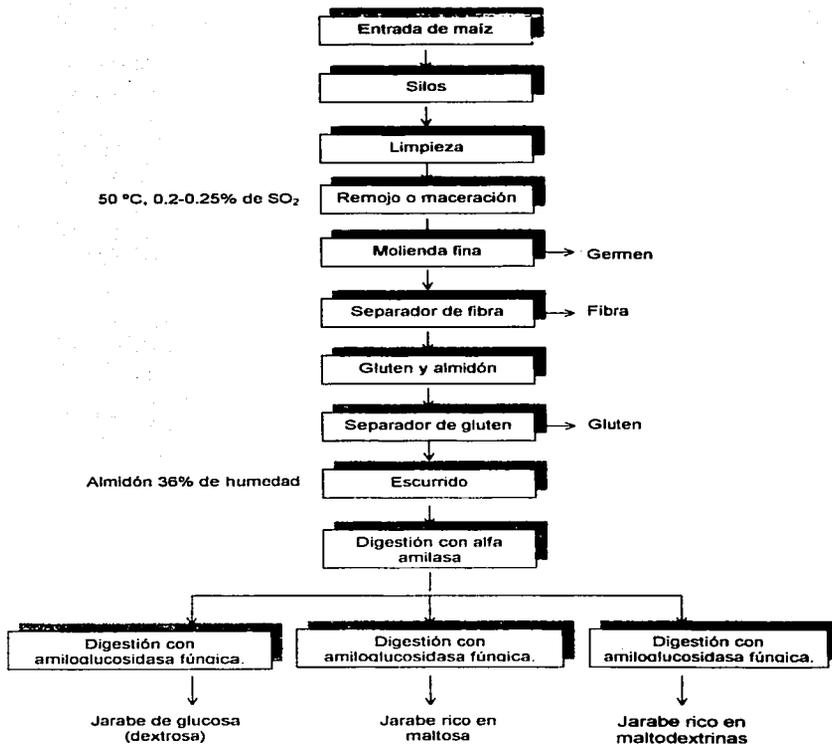


Fig. 3.1. Producción de jarabes a partir de almidón de maíz. [6,25]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Descripción del proceso.

### *Limpieza.*

Las impurezas que se encuentran en el maíz son similares a las que se encuentran en otros cereales, y los métodos adoptados para su eliminación son parecidos con el resto de los cereales. Un circuito normal de limpieza podría tener los siguientes pasos: separación magnética, cribado, cepillado-aspirado, descenso sobre mesa inclinada, separación electrostática, lavado con rebosadero para eliminar las impurezas que flotan y secado. A medida que se recibe el maíz, se limpia antes de almacenarse en la planta. La selección y limpieza por aspiración con vacío elimina todos los materiales indeseables como son polvo, desechos, mazorcas, piedras e insectos.

### *Silos.*

La principal función de los silos es la de ofrecer un almacenamiento inmediato, así como para su prelimpieza.

### *Remojo o maceración.*

El remojo o también llamado maceración del maíz se lleva a cabo a aproximadamente 50 °C con 0.2-0.25 % de solución acuosa de SO<sub>2</sub>, actuando como agentes conservadores. La etapa de remojo acelera la separación almidón/proteína. El grano se remoja hasta aproximadamente 48 horas, haciéndose recircular el agua de remojo a través de los recipientes.

### *Separación del germen.*

En esta etapa se tritura groseramente el maíz con el objeto de liberar el germen del resto del grano sin romper o machacar el germen. Para esta operación, se

puede utilizar molinos de rodillos con dientes metálicos. Un rodillo gira a 900 rev/min, mientras el otro permanece inmóvil. La separación del germen se consigue mediante hidrociclones. [35]

#### *Molienda fina.*

Una vez que es eliminado el germen del grano, se reduce de tamaño mediante dos molinos finos, que pueden ser de impacto o de erosión. Después de esta etapa, el almidón y la proteína del endospermo, quedan en estado muy dividido y permanecen en suspensión.

#### *Separación de cáscaras y fibra.*

El material molido fino que sale de los molinos finos fluye a través de tanques y se bombea entonces a una unidad de tamices cónicos de 4 etapas para el lavado de las cáscaras. A efectos de lavado, se agrega agua de proceso a contracorriente. La leche de almidón en bruto contiene aún fibras finas, por tal motivo, se bombea a través de un refinador a chorro, con el fin de recuperar el almidón de estas fibras mediante lavado y cernido. El refinador a chorro está provisto con un tamiz de malla de aproximadamente 50 micrones.

#### *Separación del gluten.*

La leche de almidón libre de fibras se concentra parcialmente en un espesor-concentrador, con el fin de remover el agua que contiene principalmente proteínas solubles. El gluten es separado de la leche de almidón en una estación de separación centrífuga de 4 etapas. En esta etapa, también se agrega agua de lavado a contracorriente. El primer separador sirve para separar el agua de gluten libre de almidón de la leche de almidón. El segundo, tercero y cuarto se emplean como separadores de refinado para remover todo el gluten que sea posible por etapa; es decir la fracción de leche de almidón requiere concentración máxima.

### *Escurreido.*

La leche de almidón purificada a 21 °Bé, se bombea desde un receptor de los separadores centrífugos, hasta un pelador centrífugo, donde se escurre hasta 36% de humedad.

### *Digestión con $\alpha$ amilasa bacteriana (licuefacción).*

Como se puede observar en la figura 1, el uso de  $\alpha$  amilasa solo se aplica en la digestión primaria del almidón (etapa, que también es conocida como licuefacción). Esta etapa es indispensable para la formación de jarabes de cualquier tipo, a partir de almidón de maíz.

La licuefacción (fig. 3.2), puede llevarse a cabo por diferentes procesos:

- |  |        |
|--|--------|
| 1. Enzima - calor – enzima             | (EHE)  |
| 2. Temperatura baja                    | (LT)   |
| 3. Doble enzima - doble calentamiento  | (DEDH) |
| 4. Doble enzima - simple calentamiento | (DESH) |
| 5. Licuefacción térmica                | (TL)   |

### *Sacarificación.*

Un segundo paso en la elaboración de jarabes, es la sacarificación, la cual consiste en la formación de partículas de bajo peso molecular (glucosa, maltosa, oligosacáridos) con la ayuda de diferentes enzimas que determinan la composición final del jarabe. Por ejemplo, para la producción de jarabes de glucosa suele utilizarse amiloglucosidasas, para la producción de dextrosa, hasta un 90-92 % del total de almidón hidrolizado. Para el caso de jarabes de fructosa, -

se obtiene mediante la isomerización de la dextrosa con ayuda de la enzima glucosa isomerasa.

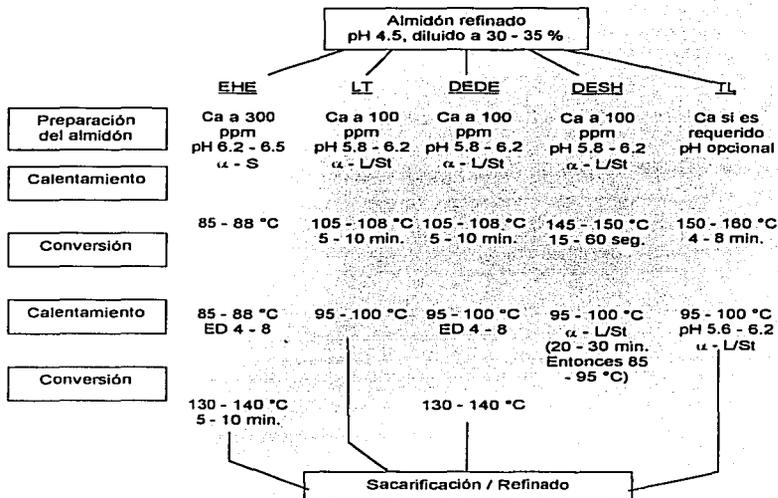


Fig. 3.2 Procesos de licuefacción del almidón mediante enzimas.  $\alpha$ -L/St corresponde a alfa amilasa de *B. Licheniformis* o *B. Stearothermophilus*. [53]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.3 Justificación para este trabajo, del uso de *Bacillus licheniformis* como cepa productora de $\alpha$ amilasa.

La producción de  $\alpha$  amilasa es producida por fuentes bacterianas (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amiloliquefaciens*) y por fuentes fúngicas (*Aspergillus SP*) [44]. La producción de  $\alpha$  amilasa a partir de *Bacillus amiloliquefaciens* ocupa el segundo lugar en producción mundial de enzimas después de las proteasas producidas por microorganismos del mismo género, teniendo como principales productores Estados Unidos y Europa [21]. Sin embargo, la termoestabilidad de las  $\alpha$  amilasas (tabla 3.1) es relevante en la hidrólisis enzimática del almidón. La licuefacción es la disrupción de un gránulo insoluble de almidón por calentamiento (de 60 °C a 105 °C dependiendo del tipo de material crudo), seguido de hidrólisis parcial para reducir la viscosidad de la solución resultante. Con las enzimas menos estables, la disrupción por calor y la hidrólisis parcial, tienen lugar en estadios separados, dentro del proceso global. Con enzimas termoestables, los dos pasos pueden combinarse en un solo paso [24].

Concerniente a la extracción y purificación de la  $\alpha$  amilasa, se sabe que es una enzima extracelular, lo cual disminuye los costos implicados en la separación de la enzima de la célula. [44,50,5]

Tabla 3.1 Termoestabilidad de las  $\alpha$  amilasas.

Fuente de la enzima.	Temperatura normal de uso.	Temperatura máxima de uso.
Páncreas de porcino.	40-45 °C	50 °C
<i>Aspergillus SP</i>	55-60 °C	65 °C
<i>Bacillus amiloliquefaciens</i>	70 °C	85-90 °C
<i>Bacillus licheniformis</i>	92 °C	110 °C

Gacesa 1990

En la tabla 3.2, se resumen las características que presentan las enzimas amilolíticas correspondientes a cada tipo de microorganismo. Analizando la tabla 3.2, nos podemos dar cuenta que las enzimas producidas por *Bacillus licheniformis*, presenta ventajas sobre los dos microorganismos restantes en cuanto a su termoestabilidad.

La tabla 3.2 presenta la comparación entre los diferentes microorganismos productores de  $\alpha$  amilasa y sus propiedades. Como se puede observar en la tabla 3.2, los productos finales después de un tratamiento con  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* son moléculas de menor peso molecular, lo cual representa una mayor eficiencia en la disrupción del almidón [31]. La constante de Michaelis-Menten, presenta un valor menor, lo cual representa una ventaja para la velocidad específica de crecimiento, aumentando su valor [Apéndice 2]. Respecto a la actividad residual, esta presenta una actividad residual del 100 % después de 6 h a 70°C. [5]

Analizando la tabla 3.2, es notorio que las características mas apropiadas para la disrupción del almidón, las presenta las enzimas producidas por el *Bacillus licheniformis*, mostrando un rango de pH más amplio que los demás y asegurando así una mayor seguridad en el cambio de pH en el caldo de cultivo. El pH óptimo de las enzimas provenientes de los microorganismos, pueden variar de acuerdo al tipo de sepa por ejemplo,  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis*, en algunas ocasiones presenta un rango de pH de 6.0 a 7.0 [59] La temperatura óptima de reacción, es mucho mayor para enzimas de las cepas de *Bacillus licheniformis*, sobre las variedades de *Bacillus amiloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, asegurando una cinética de reacción más acelerada. Además de presentar una temperatura más apropiada para la hidrólisis del almidón en la fase de liquefacción. La temperatura optima de  $\alpha$  amilasa, también varía de acuerdo al tipo de cepa, por lo cual es común encontrar valores de 85 °C a 90 °C. El valor de la temperatura, suele ser elevado cuando se trabaja con enzimas

térmicamente estables, dependiendo del tiempo de reacción, que comúnmente son cortos.

Tabla 3.2. Comparación de las propiedades de *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* (saccharifying  $\alpha$  amylase), *B. Amyloliquefaciens* (liquefying  $\alpha$  amylase) y *B. Licheniformis* (enzimas amilolíticas).

<i>B. subtilis</i> var.			
	<i>Amylosacchariticus</i>	<i>B. Amytoliquefaciens</i>	<i>B. Licheniformis</i>
PH optimo	6.8	5.9	7.7-9.0
Temperatura optima °C.		70	90
Termoestabilidad (50% de inactivación, °C)	68	80	-
Limite de hidrólisis sobre almidón soluble (%)	43	16	
Peso molecular	41100	49000	62000
Punto isoelectrico	-	5.2	5.2
Productos finales	Glucosa, maltosa	Maltohexosa	Maltosa, maltotriosa, maltopentosa
$K_m$ (almidón)	2.31 mg ml <sup>-1</sup>	6.9 mg ml <sup>-1</sup>	0.8 mg ml <sup>-1</sup>
Actividad residual después de 6 h a 70°C en presencia de calcio (5ppm) y ausencia de sustrato (%)	-	0	100

Atkinson 1986

Por otra parte los iones de calcio a concentraciones de solo 4 ppm estabilizan la  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* hasta el punto en que puede retener el 100 % de su actividad después de 6 horas de incubación a 70 °C y pH de 7.0; en ausencia de calcio, esas mismas condiciones de temperatura y pH, bastan para su total inactivación en solo 4 horas.

La  $\alpha$  amilasa pertenece al grupo de enzimas que se usan generalmente como catalizadores industriales, como se había mencionado, en la producción de jarabes de maíz. Normalmente las enzimas que se utilizan con el propósito de catalizadores industriales, suelen ser de bajo costo y de gran demanda, a lo contrario de aquellas enzimas que son producidas en pequeñas cantidades y con un elevado costo de producción [60]. El hecho de que la  $\alpha$  amilasa sea una enzima extracelular [8, 45], contribuye a reducir costos de extracción, si se le compara con una enzima intracelular.

La enzima  $\alpha$  amilasa extraída de bacterias se vende usualmente como preparaciones líquidas, las cuales se conservan con 20% de cloruro de sodio. Las formulaciones líquidas más activas contienen 2% de enzima activa, y la formulación sólida más activa contienen un 5% de enzima activa.

### **3.4 Producción de $\alpha$ amilasa.**

La producción de una enzima comprende desde la preparación del inóculo, pasando por la etapa fermentativa, y culminando en su extracción y purificación. La  $\alpha$  amilasa producida por *Bacillus licheniformis* es liberada fuera de la célula en las fermentaciones, por lo cual se le considera como una enzima extracelular. La fig. 3.3 representa el proceso generalizado para la obtención de enzimas extracelulares.

#### **3.4.1 Etapas de preparación del inóculo.**

##### *a) Conservación de la cepa productora.*

Para una determinada cepa, no solo es suficiente su conservación, sino también la capacidad de formación de producto. La conservación de las cepas, se puede realizar por tres medios [16]:

- a) Refrigeración (2 a 6 °C) por un periodo de 8-16 semanas.
- b) Congelación (-18 o -80 °C) por un periodo de conservación de varios años.
- c) Liofilización (secado por congelación) que ofrece tiempos de conservación ilimitados.

##### *b) Preparación del inóculo.*

El inóculo conservado es restablecido por crecimiento en cultivos líquidos agitados o en medios sólidos. Las condiciones del cultivo (medio, temperatura de incubación) inicial dependerán del proceso en específico. Los tiempos estándares de crecimiento, pueden ser expresados de la siguiente forma:

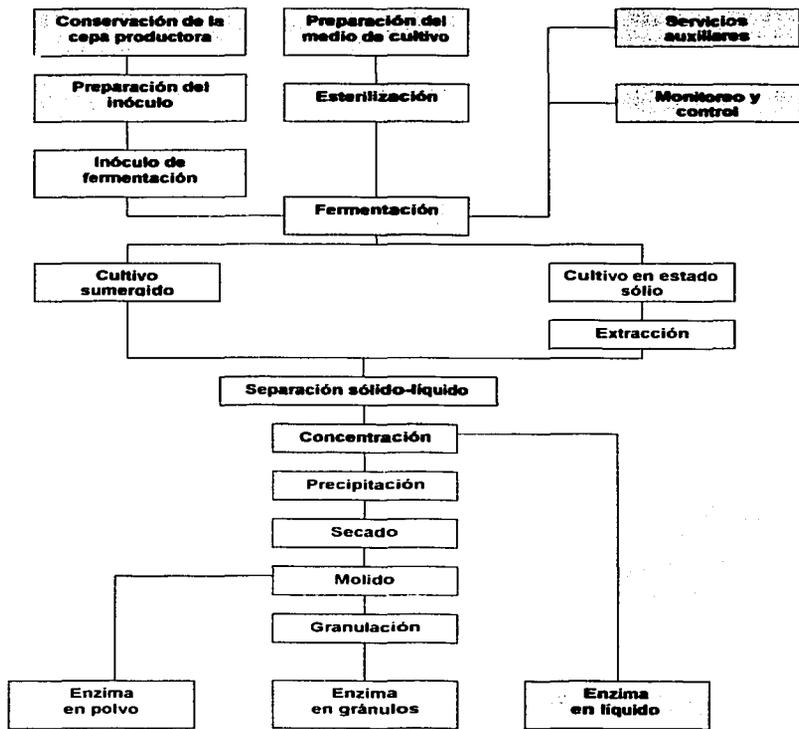


Fig. 3.3 Proceso generalizado para la producción de enzimas extracelulares. □ Posible ruta para la producción de  $\alpha$  amilasa en estado líquido, a partir de *Bacillus licheniformis*. [34]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cultivos liofilizados	4-10 días.
Cultivos congelados	
Bacterias	4-48 horas
Actinomicetos	1-5 días
Hongos	1-7 días
Cultivos refrigerados	
Bacterias	4-24 horas
Actinomicetos	1-3 días
Hongos	1-5 días

**c) Inóculo de fermentación (cultivo anterior a la fermentación productiva).**

Los cultivos anteriores a la fermentación productiva tiene la función de proveer de suficiente inóculo para la fermentación principal. Si esta comienza con poca cantidad de inóculo, el crecimiento puede ser disminuido y la velocidad de formación de producto insatisfactoria. En general las concentraciones recomendadas de inóculo son a menudo las siguientes:

Bacterias	0.1-0.3 %
Actinomicetos	5-10 %
Hongos	5-10 %
Esporas en suspensión	$1-5 \times 10^5$ /lt solución de cultivo

### **3.4.2 Fermentación productiva**

La parte medular para la producción de enzimas, se encuentra en la fermentación, donde se producen la mayor parte del material enzimático, que la célula requiere para su crecimiento y su metabolismo energético. La fermentación puede realizarse por cultivos sumergidos (donde las células se encuentran dispersas libremente) y en cultivos en estado sólido (las células se encuentran inmovilizadas). La forma más recomendable para la síntesis de  $\alpha$  amilasa a partir

de *Bacillus licheniformis* se encuentra en los cultivos sumergidos. [20] Existen una serie de factores importantes que hay que tener en cuenta para la producción de enzimas y en el caso más específico para la producción de  $\alpha$  amilasa.

#### 3.4.2.1 Velocidad de crecimiento y estados de crecimiento en los cuales se sintetiza la enzima.

Normalmente la producción de  $\alpha$  amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* es sintetizada en la fase exponencial de crecimiento, lo cual indica que la enzima se produce de forma asociada al crecimiento. [44,47] Sin embargo para *Bacillus licheniformis* 44MB82-G presentan la mayor parte de la producción enzimática a lo largo de la fase estacionaria y parte de la fase de muerte celular, cuando se usa glucosa como principal fuente de carbono. [57] La cinética de síntesis de las enzimas no puede ser expresada en una ecuación para todas las enzimas. En lugar de ello un conjunto de parámetros de velocidad de síntesis y su relación con velocidad de crecimiento  $\mu$  puede indicar el valor de  $\mu$  que corresponda en un máximo de producción. correspondiente a las condiciones óptimas de crecimiento.

#### 3.4.3 Condiciones de fermentación.

##### 3.4.3.1 Temperatura.

La temperatura de producción de  $\alpha$  amilasa se encuentra en el intervalo de temperatura de los 30 a los 40 °C, siendo los 40 °C la temperatura óptima de producción de  $\alpha$  amilasa. [44,5,47,57]

##### 3.4.3.2 pH.

Los valores recomendables para el pH son de preferencia cercanos al neutro. [5] Si el pH baja a 6, la enzima se desnaturaliza, por lo cual es recomendable usar carbonato de calcio como sustancia buffer.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.4.3.3 Aireación.

El flujo de aire recomendable para la fermentación es de 1 vvm. [47,57]

### 3.4.3.4 Velocidad de agitación.

El nivel de agitación que mejor favorece la productividad enzimática a nivel laboratorio es de 500 RPM. Cerca de las 600 RPM, la actividad enzimática disminuye considerablemente, lo cual hace pensar en sensibilidad al corte a elevadas velocidades de agitación. Por debajo de las 400 RPM la actividad enzimática disminuye, tal vez por razones difusionales. [57]

### 3.4.3.5 Represión del catabolito

La síntesis de muchas enzimas extracelulares, está controlada por la represión del catabolito o el producto final. La  $\alpha$  amilasa de algunas cepas de *Bacillus licheniformis* experimenta represión por el catabolito por los productos finales mayoritarios de la hidrólisis del almidón con  $\alpha$  amilasa, tal como sucede con la presencia de glucosa libre en el caldo de cultivo, que incluso inhibe de forma total la síntesis de  $\alpha$  amilasa en cultivo discontinuo (batch) [44]. El principal represor en la disrupción del almidón a partir de *Bacillus licheniformis* es la glucosa. En la actualidad es posible encontrar cepas de *Bacillus licheniformis* capaces de soportar elevadas concentraciones de glucosa, incluso de usar esta como fuente de carbono para su metabolismo energético. Esto hace pensar que el microorganismo consume las moléculas más sencillas, en este caso la glucosa. Cuando esta se agota los compuestos más complejos como el almidón son degradados, para lo cual se genera la necesidad de sintetizar enzimas capaces de realizar este trabajo. Es por eso que para el *Bacillus licheniformis* 44MB82-G la formación de  $\alpha$  amilasa se presenta antes de la fase de equilibrio en el crecimiento celular, cuando existe glucosa inicialmente en el medio de fermentación.

#### 3.4.3.6 Tiempo de incubación.

El tiempo de incubación depende de la represión de metabolito o catabolito. Es de esperarse que cuando el almidón es fraccionado, se produzca cierta cantidad de azúcares simples que puedan inhibir la síntesis de  $\alpha$  amilasa. El periodo aproximado de incubación para la mayoría de la cepas de *Bacillus licheniformis* en cultivo discontinuo (batch), varía de 15 a 20 hr. [51] Pero para aquellas cepas que son resistentes a la glucosa, el tiempo de incubación puede prolongarse hasta las 120 hr. [57]

El uso de cultivos aerobios sumergidos en reactores de tanque agitado es el proceso típico para la producción de enzimas extracelulares entre microorganismos. [25] En la fig. 3.4 se representa un esquema típico para la producción de enzimas.

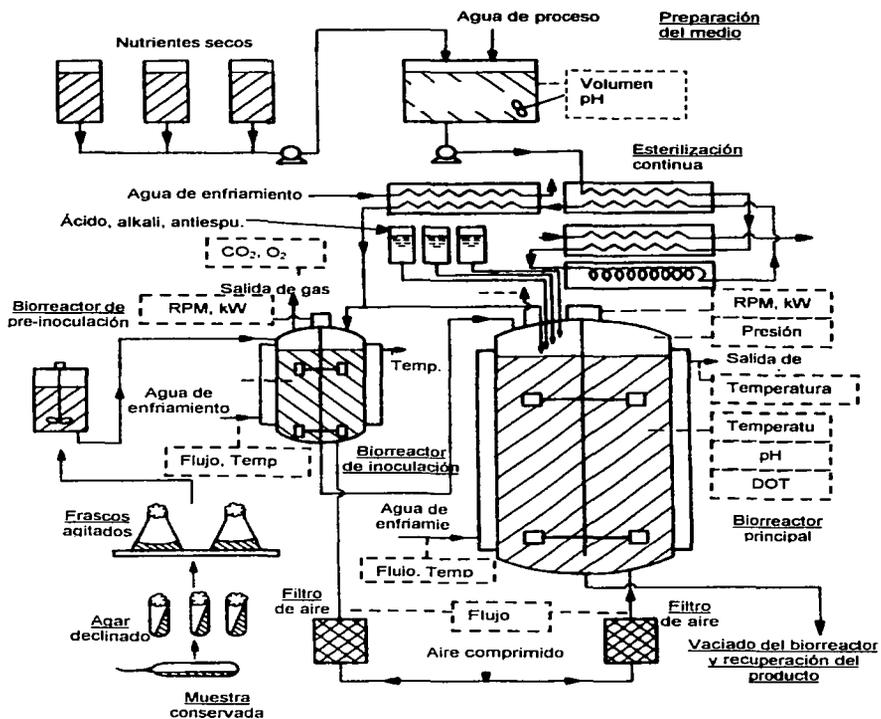


Fig. 3.4 Representación esquemática de una fermentación típica para la producción de enzimas. [49]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **4. BIOREACTORES.**

### **4.1 Clasificación de los reactores biológicos.**

Los bioreactores se pueden clasificar de diferentes formas:

1. De acuerdo a la forma de adición de sustratos en las múltiples configuraciones de reactores biológicos.
2. De acuerdo a la forma en que se encuentre el microorganismo dentro del reactor (inmovilizada o suspendida libremente)
3. De acuerdo a la forma en que se lleve el mezclado del caldo de cultivo: agitación mecánica fig. 4.2, agitación gaseosa fig. 4.3 y agitación externa fig. 4.4
4. De acuerdo al tipo de biocatalizador (enzimas, microorganismos aeróbicos, anaerobios).

Existe una amplia gama de configuraciones de biorreactores, que se aplican bajo diferentes condiciones de operación, establecidas por el tipo de microorganismo y de sus demandas metabólicas. Entre los más comunes basta por mencionar los siguientes:

- Tanque agitado.
- Columna de burbujas.
- Reactores de tiro o corriente de aire.
- Lechos empaquetados.
- Lechos fluidizados.
- Lecho de goteo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **4.2 Bioreactores de tanque agitado.**

Los reactores de tanque agitado, a escala industrial, tienen la ventaja de requerir un bajo costo de capital y de bajos costos de operación. Estos reactores, son utilizados para cultivos aerobios y anaerobios, siendo para estos últimos de una configuración más sencilla. Lo que se busca en el diseño de los reactores agitados, es el aseguramiento de una buena mezcla del caldo de cultivo y de una mayor dispersión del oxígeno, para el caso de cultivos aerobios.

La mezcla y dispersión de las burbujas se facilita mediante el uso de rodetes, lo cual requiere una gran cantidad de energía por unidad de volumen. Se hace uso de deflectores que impiden la formación de vórtices. En los fermentadores altos, se utilizan con frecuencia varios rodetes, para mejorar el mezclado dentro del reactor. Algunos cultivos generan espuma, por lo cual es necesario considerar un espacio libre de líquido (30 al 30 %) dentro del reactor, además de instalar rodetes con la función de romperla.

El factor de forma o relación altura diámetro, esta en función del tiempo de contacto entre las burbujas y el medio; por lo tanto esta relación crecerá conforme aumente el grado de aereación requerido. Los reactores de tanque agitado, requieren de un sistema de eliminación de calor, lo cual se consigue mediante la instalación de camisas o de serpentines de refrigeración, ya sea interno o externos.



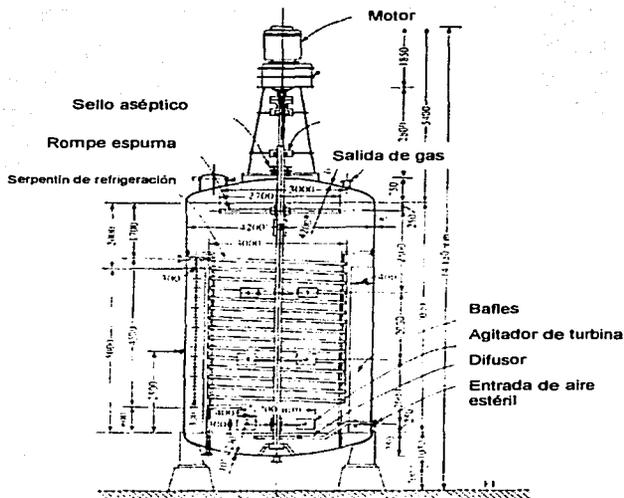


Fig. 4.1 Fermentador usado para la producción de penicilina de 100 m<sup>3</sup> [5]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

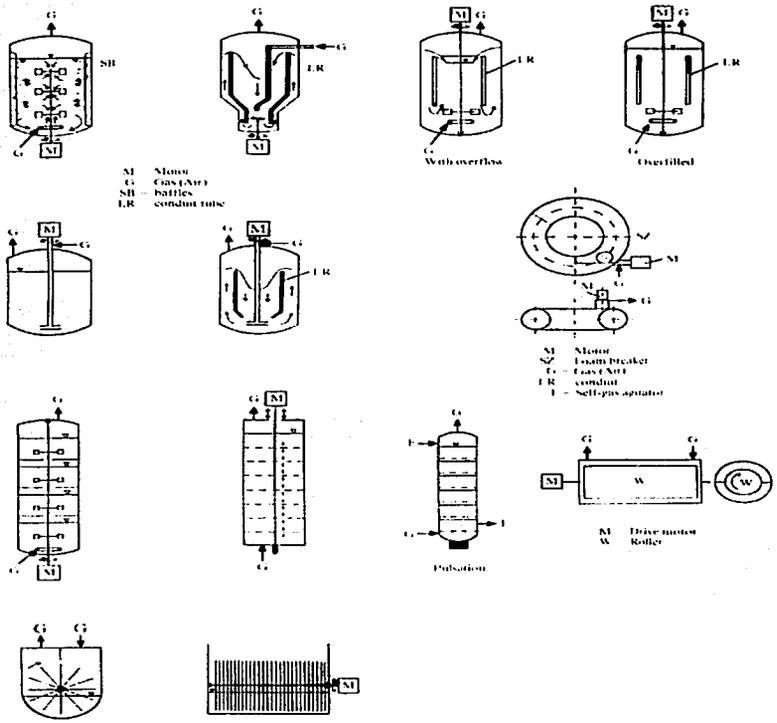


Fig. 4.2 Biorreactores con agitación mecánica [5].

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

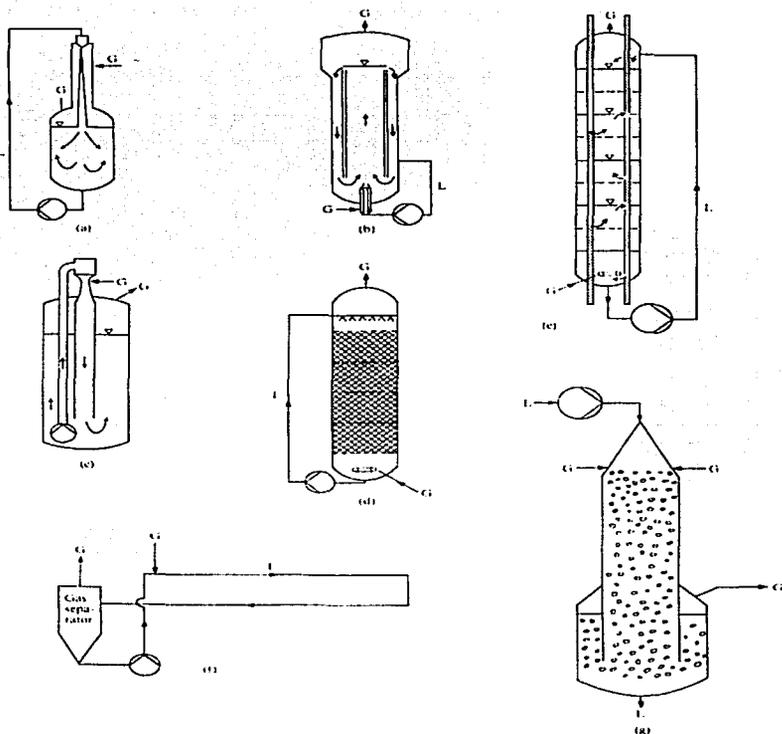


Fig. 4.3 Biorreactores agitados de forma externa mediante el movimiento del caldo de cultivo impulsado por bombas [5]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

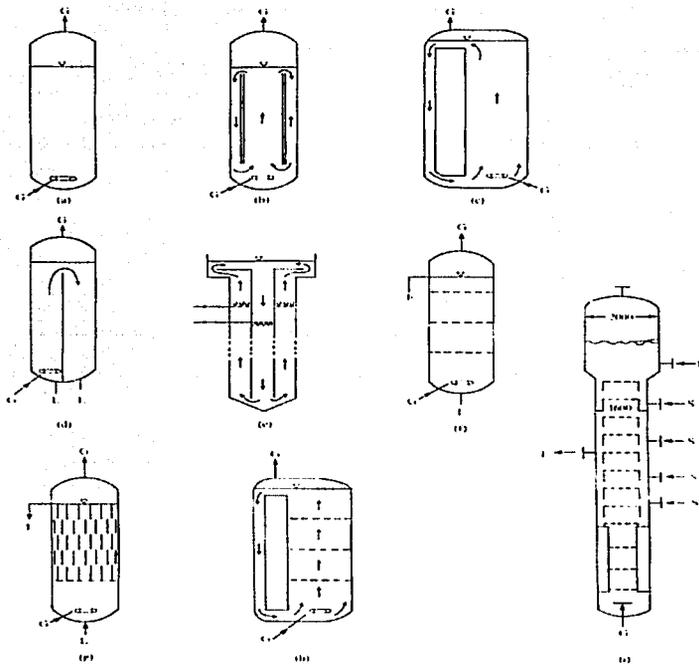


Fig. 4.4 Reactores agitados por aire comprimido [5].

Los fermentadores de tanque agitado, se utilizan para reacciones con enzimas libres e inmobilizadas, así como para el cultivo de células en suspensión o inmobilizadas; y cuando se utilizan determinados catalizadores que nos son fácilmente dañados por el rodete encargado del mezclado.

El uso de reactores agitados, es factible cuando se trabajan con volúmenes de producción menores de 500 m<sup>3</sup> ya que arriba de este valor, la potencia necesaria para conseguir una mezcla adecuada llega a ser extremadamente alta. [42,21] Es recomendable también en cultivos que presenten viscosidades altas, facilitando así la transferencia de masa.

#### 4.3 Bioreactor de columna de burbujas.

En este tipo de reactores, la mezcla del caldo de cultivo y la aereación, se lleva a cabo mediante la inyección de gas; lo cual elimina gastos en energía por agitación mecánica (Fig. 4.5). Este tipo de reactores, son usados industrialmente en la producción de levadura de panadería, cerveza y vinagre, y en el tratamiento de aguas residuales. A diferencia de los reactores de tanque

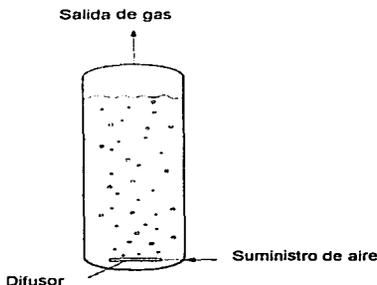


Fig. 4.5 Biorreactor de columna de burbujas. [21]

agitado, estos disminuyen el número de estructuras internas. La altura del reactor, debe ser mayor que el diámetro, dado que la transferencia de oxígeno al caldo de cultivo, se da por libre ascensión de las burbujas. En la producción de levadura de panadería, es normal utilizar relaciones de altura diámetro de 3:1, mientras que en otras aplicaciones pueden utilizarse torres con relaciones de 6:1. Algunas veces, en reactores de columna muy altos, se instalan placas horizontales con superficies perforadas para evitar la coalescencia de las burbujas y lograr una mejor distribución del aire. Las ventajas de los reactores de columna de burbujas incluyen los bajos costos de capital, la ausencia de partes móviles y un adecuado rendimiento de transferencia de masa. [24]

La formación de las burbujas, define el comportamiento de la hidrodinámica de la columna de burbujas y de la transmisión de calor. Existen diferentes regímenes de flujo dependiendo del caudal de gas, del diseño del difusor, del diámetro de la columna y de las propiedades del medio. Normalmente, se trabaja a caudales de gas, donde se desarrolla un flujo caótico de circulación, y se forma un flujo heterogéneo, en este régimen, las burbujas y el líquido ascienden por el centro de la columna, mientras que en la proximidad de las paredes existe un flujo descendente de líquido, formándose así, corrientes de gas retromezclado.

#### **4.4 Bioreactor de tiro o corriente de aire.**

La mezcla del caldo de cultivo, en estos reactores, también se produce por inyección de gas a presión (Fig. 4.6). Los reactores de tiro de aire, se utilizan a menudo para cultivos de células animales y vegetales, y catalizadores inmovilizados porque los niveles de cizalla son bastante inferiores que en los reactores agitados. En estos reactores, las corrientes de flujo, están bien definidas debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes. El gas es inyectado por una sección del reactor denominado ascensor (*riser*).

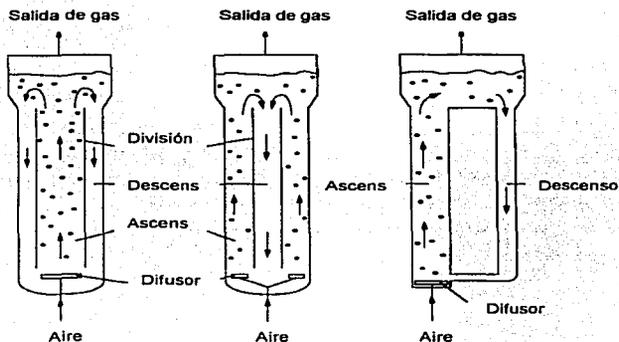


Fig. 4.6 Reactores de tiro de aire. [21]

La presencia de gas en el líquido, provoca una disminución de densidades, lo cual provoca un movimiento ascendente del líquido en el *riser*. El gas se retira del líquido en la parte superior del reactor, dejando el líquido más pesado libre de burbujas y se recircula a través del conducto descendente (*downcomer*). La configuración de tiro de aire, le confiere un grado de estabilidad al flujo del líquido en comparación con el de columna de burbujas, pudiendo utilizarse mayores caudales de gas, sin producir problemas de operación como puede ser el flujo de pistón o nebulizaciones. Los reactores de tiro de aire, se han utilizado en la producción de proteínas de origen unicelular a partir de metanol y gasoil, así como en el cultivo de células animales y vegetales y en el tratamiento de aguas municipales y para la industria.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4.5 Bioreactores de lechos empacado.**

Los reactores de lecho empacado, consisten de un tubo generalmente vertical, relleno o empacado con partículas de catalizador inmovilizado (Fig. 4.7). El medio de cultivo puede alimentarse por la parte superior o inferior de la columna y forma una fase líquida continua entre las partículas. Este tipo de reactores, ha sido utilizado a escala comercial con células o enzimas inmovilizadas para la producción de aspartato y fumarato, la conversión de penicilina a ácido 6-aminopenicilánico y en la resolución de isómeros de aminoácidos.

La transferencia de materia entre el medio líquido y el catalizador sólido se facilita trabajando a caudales elevados de líquido a través del lecho, para lo cual normalmente se recircula el líquido. La aireación en los lechos empacados, se realiza generalmente en un recipiente separado, ya que si se inyectara aire directamente en el lecho, la coalescencia de las burbujas produciría bolsas de gas y canalizaciones o una distribución deficiente del flujo. Los lechos empacados, por consiguiente, no pueden ser utilizados en procesos, donde se produzcan grandes cantidades de dióxido de carbono u otros gases que puedan ser atrapados en el relleno.

#### **4.6 Bioreactor de lecho fluidizado.**

Los reactores de lecho fluidizado, son muy similares a los de lecho empacado, solo con la diferencia de que en estos, el material de empaque o inmovilización, no se encuentran fijos (fig. 4.9). El aire puede ser alimentado por la parte inferior del reactor, sin problemas de acumulación entre las partículas de empaque. Este tipo de reactores se utiliza en el tratamiento de residuos con arena o un materia similar que soporta las mezclas de poblaciones microbianas. También puede utilizarse con organismos floculantes en los procesos de fabricación de cerveza o en la producción de vinagre.

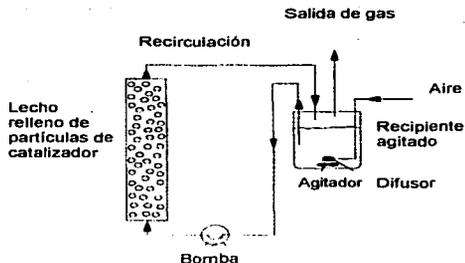


Fig. 4.7 Reactor de lecho empaquetado, con recirculación del medio. [21]

#### 4.7 Bioreactores de lecho por goteo.

Este tipo de reactor, es otra variación del lecho empaquetado (fig. 4.8). El líquido o caldo de cultivo, es rociado en forma de rocío (spray), en la parte superior del empaquetamiento y las gotas descienden a través del lecho en forma de pequeñas corrientes. El aire puede introducirse por la parte inferior del reactor, y puesto que la fase líquida no es continua, el aire o cualquier gas, se mueve con relativa facilidad a través del empaquetamiento. Este tipo de reactores se utilizan ampliamente en el tratamiento de aguas residuales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

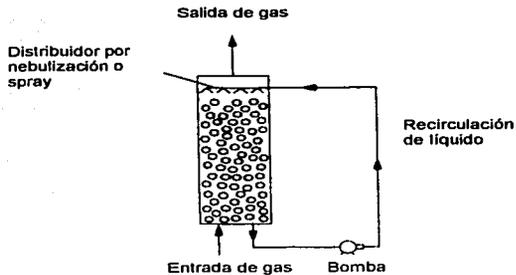


Fig. 4.8 Reactor de goteo. [21]

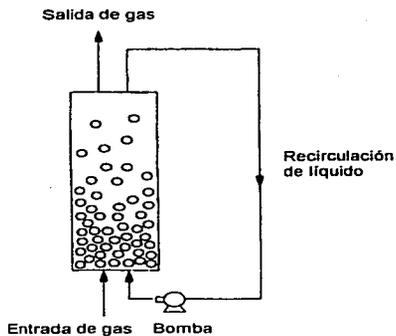


Fig. 4.9 Reactor de lecho fluidizado. [21]

#### **4.8 Formas de operación de biorreactores.**

Las principales formas de operación en biorreactores son cultivos de tipo continuo, intermitente (batch) y derivaciones del cultivo batch. A continuación se resumen los principales tipos que operan los biorreactores.

1. Discontinuo o batch.

2. Semibatch o semicontinuo.

a) Sin control de recirculación.

1. Adición intermitente.
2. Semibatch constante.
3. Semibatch exponencial.
4. Semibatch optimizado.

b) Con control de recirculación.

1. Control indirecto recirculado
2. Control directo recirculado.
3. Control de valor constante.
4. Control óptimo.

3) Semibatch recirculado.

4) Batch recirculado.

5) Cultivo continuo.

a) Cultivo continuo sin ningún control de recirculación en el quimiostato.

b) Cultivo continuo con control de recirculación.

- 1) Turbidostato.
- 2) Nutriostato.
- 3) Auxostato.

Las tres principales formas de operación comúnmente usadas a escala industrial son batch, semibatch y continuo [2]. Cada una de estas formas de operación han servido para resolver problemas específicos de procesos biotecnológicos, dado que no todos los sistemas biológicos se comportan de la misma forma en su funcionamiento metabólico.

En la fig. 4.10 se muestra de forma gráfica el comportamiento general que exhibe la concentración de sustrato respecto a la concentración celular, en función del tiempo para: a) cultivo batch, b) semibatch, c) continuo.

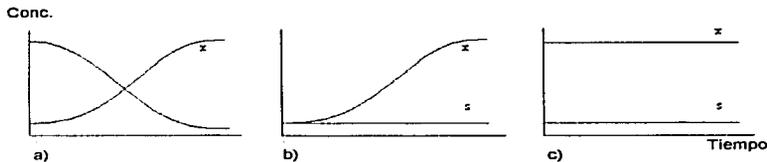


Fig. 4.10 Comportamiento general de los principales tipos de operación de biorreactores. [2]

En el cultivo batch la concentración de sustrato y la concentración de biomasa cambian inversamente proporcional conforme transcurre el tiempo; mientras que en el cultivo continuo la concentración de biomasa y la concentración de sustrato

tienden a permanecer constantes durante el tiempo de cultivo. En el cultivo semibatch la concentración de sustrato permanece constante, mientras que la concentración de biomasa se incrementa conforme avanza el tiempo.

#### **4.8.1 Cultivo intermitente o batch.**

En el cultivo batch todos los nutrientes, así como las sustancias amortiguadoras de pH y otros químicos son agregados al principio del cultivo a excepción del oxígeno cuando se trata de un proceso aerobio, el cual se debe estar administrando continuamente. Una vez obtenido los niveles deseados de producto o productos, estos son retirados del reactor biológico.

Independientemente del tipo de reactor biológico usado, lo que se busca es que los componentes del caldo de cultivo se mantengan de forma homogénea, para lo cual la mayoría de los biorreactores son tanques agitados. [2]

La rentabilidad de un sistema batch esta en función del tiempo necesario para obtener niveles deseados de los metabolitos sintetizados, de tal manera que los costos de operación se reducen mientras menor sea el tiempo de cultivo.

El tiempo total ( $t_r$ ) de reacción el cultivo batch es la suma de todos los tiempos que consumen operaciones inherentes a la preparación del cultivo tal que:

$$t_r = t_b + t_p + t_1 + t_{hr} \quad (4.1)$$

Donde:

$t_b$  = tiempo de reacción en cultivo batch.

$t_1$  = tiempo de adaptación o lag.

$t_p$  = tiempo necesario para limpiar, esterilizar y preparar el reactor.

$t_{hr}$  = tiempo de recuperación del producto del reactor.

El tiempo de reacción necesario para producir una determinada concentración de biomasa, de producto o de disminución en la concentración de sustrato, puede obtenerse por sencillos balances de materia. Considerando que el volumen en el biorreactor se mantiene constante y que no hay entrada ni salida de producto, se llega a la siguiente ecuación para la concentración de biomasa:

$$\frac{dXV}{dt} = \mu XV - k_d XV \quad (4.2)$$

Donde:  $X$  = concentración de biomasa.  
 $\mu$  = velocidad específica de crecimiento.  
 $k_d$  = velocidad específica de muerte celular.  
 $V$  = volumen del medio de cultivo.

Dado que la velocidad específica de crecimiento es constante en la mayoría del período de crecimiento exponencial e igual a la velocidad específica de crecimiento máxima y  $k_d$  puede considerarse constante, integrando la ecuación (4.2) y considerando que a  $t = 0$ ,  $x = x_0$ , siendo  $x_0$  la concentración de células inicial, se tiene que:

$$X = X_0 e^{(\mu_{\max} - k_d)t} \quad (4.3)$$

De la ecuación (4.3) se obtiene que el tiempo de cultivo batch ( $t_b$ ) necesario para llegar a una concentración de biomasa final  $X_f$  es:

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max} - k_d} \ln \left( \frac{X_f}{X_0} \right) \quad (4.4)$$

Donde:  
 $X_f$  = concentración de biomasa final.  
 $X_0$  = concentración de biomasa inicial.

De la misma forma, se pueden predecir los tiempos en función de las concentraciones de sustrato realizando un balance de materia en el biorreactor. Además si en un cultivo batch la formación de producto no está asociada al crecimiento, el tiempo de reacción será: [21]

$$\frac{d(SV)}{dt} = - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{Y_{PS}} + m_s \right) XV \quad (4.5)$$

Integrando la ecuación (4.5) y despejando el tiempo se tiene que:

$$t_b = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left[ 1 + \frac{S_o - S_f}{\left( \frac{1}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{\mu_{max} Y_{PS}} + \frac{m_s}{\mu_{max}} \right) X_o} \right] \quad (4.6)$$

Donde:  $\mu_{max}$  = velocidad específica de crecimiento máxima.  
 $S_o, S_f$  = concentración de sustrato inicial y final respectivamente.  
 $Y_{XS}$  = rendimiento de biomasa a partir de sustrato.  
 $Y_{PS}$  = rendimiento de producto a partir del sustrato consumido.  
 $Q_p$  = velocidad específica de formación de producto.  
 $m_s$  = velocidad específica de mantenimiento.

El tiempo requerido para la formación de producto en batch se obtiene realizando el siguiente balance de materia:

$$\frac{d(PV)}{dt} = Q_p XV \quad (4.7)$$

Considerando que la velocidad específica de formación de producto es constante y que la muerte celular es despreciable respecto a la velocidad específica de crecimiento se tiene que:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left[ 1 + \frac{\mu_{\max}}{X_0 Q_p} (P_f - P_0) \right] \quad (4.8)$$

Donde:  $P_f$  = concentración de producto final.  
 $P_0$  = concentración de producto inicial.

En un cultivo batch, las velocidades específicas de crecimiento celular, formación de producto y consumo de sustrato, son definidas de la siguiente forma, en cualquier etapa de la curva de cultivo.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4.9)$$

$$Q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (4.10)$$

$$Q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (4.11)$$

#### 4.8.2 Cultivo semi - continuo o fed batch.

El sistema fed batch opera con la adición continua o intermitente de uno o más nutrientes a un sistema batch. A diferencia del cultivo batch, el volumen del medio de cultivo no permanece constante y varía conforme transcurre el tiempo.

Con este tipo de operación se evita que se produzcan elevadas velocidades de crecimiento, o que se inhiba el crecimiento celular dado a las altas concentraciones de sustrato en el medio de cultivo. La velocidad de alimentación de sustrato se puede establecer de acuerdo a los niveles de oxígeno disuelto o a la composición del gas de salida. Esto es de gran importancia ya que si no se tiene una elevada difusión de oxígeno en el medio de cultivo, la velocidad de

crecimiento celular se puede ver reducida. El sistema fed batch en la practica es mas aplicada a fermentaciones que a reacciones enzimáticas. [24]

El sistema fed batch posee la ventaja sobre el cultivo batch de que se pueden controlar los cambios que presenta el rendimiento real de un metabolito deseado al cambiar la concentración de sustrato en el medio de cultivo.

El balance para la concentración celular ( $X$ ) está dado por la siguiente expresión:

$$\frac{dXV}{dt} = FX_1 + \mu XV - k_d XV \quad (4.12)$$

Donde:  $V$  = volumen que ocupa el medio de cultivo.

$F$  = flujo másico de la corriente de alimentación.

$X_1$  = flujo másico de la concentración de biomasa en la corriente de alimentación.

En el sistema fed batch el volumen del caldo de cultivo no permanece constante, por lo que su cambio con respecto al tiempo depende de la velocidad de alimentación es decir  $dV/dt = F$ .

La relación entre el flujo másico de la corriente de alimentación y el volumen del medio de cultivo se define como la velocidad de dilución  $D$ ,  $D=F/V$ .

Tomando en cuenta estas consideraciones, el cambio de células en función del tiempo será:

$$\frac{dX}{dt} = DX_1 + X(\mu - k_d - D) \quad (4.13)$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

De la misma forma, si realizamos un balance de materia para los cambios de concentración de sustrato en función del tiempo para una reacción asociada al crecimiento será:

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_i - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{Y_{PS}} + m_s \right) XV \quad (4.14)$$

Diferenciando el primer término de la ecuación (6.14) y retomando que  $D=F/V$  se tiene que:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_i - S) - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{Y_{PS}} + m_s \right) X \quad (4.15)$$

El hecho de que la velocidad de dilución depende del tiempo, hace difícil presentar de una forma integrada la dependencia de la concentración de biomasa, concentración sustrato y concentración de producto formado en función del tiempo en un sistema fed batch. Sin embargo las ecuaciones presentadas en estado transitorio pueden simplificarse haciendo las siguientes suposiciones:

a) Al comenzar la alimentación en sistema fed batch, la concentración de células ya es alta y aproximadamente constante, tomando como base un cultivo en batch, por lo que  $dx/dt = 0$ , además de que la concentración de biomasa en la corriente de entrada es nula y de que  $K_d \ll \mu$  se tiene que:

$$\mu \approx D \quad (4.16)$$

Basándose en la ecuación de Monod se puede predecir la concentración de sustrato en función de la velocidad de dilución como se muestra en la siguiente ecuación:

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \quad (4.17)$$

b) Si existen elevadas concentraciones celulares, se considera que el sustrato alimentado se consume casi de forma inmediata por lo que la concentración de sustrato en el medio de cultivo es muy pequeña en comparación a la cantidad de sustrato que se alimenta, por lo que  $ds/dt = 0$ , si además, si la formación de producto está asociado al crecimiento y si las necesidades de mantenimiento celular son despreciables, puede determinarse la concentración de biomasa en función del contenido de sustrato en la corriente de alimentación a partir de la ecuación (4.15).

$$X = Y_{XS} S_i \quad (4.18)$$

Con las anteriores suposiciones, los términos diferenciales desaparecen en las ecuaciones (4.11) y (4.12), aparentando estar en estado estacionario, con lo cual es posible predecir cambios en las concentraciones de biomasa, producto y consumo de sustrato, como se muestra en las ecuaciones (4.13) y (4.14).

#### 4.8.2.1 Cultivo semibatch sin control feedback.

El control feedback consta de un monitoreo de las condiciones por las que atraviesa el medio de cultivo, como cambios en el pH, concentración de oxígeno disuelto, concentración de metabolito, coeficiente de respiración, turbidez del medio de cultivo y presión parcial del  $CO_2$ , de manera que los niveles establecidos de estos no cambien. En el cultivo semibatch sin control de feedback, el caudal de alimentación de medio nuevo que entra al reactor, cambia de acuerdo a un patrón de flujo establecido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los patrones de flujo comúnmente usados son:

- a) En la *adición intermitente*, la alimentación del sustrato se hace de forma discontinua a diferentes intervalos de tiempo.
- b) En *semibatch constante* la alimentación de sustrato limitante se hace de forma continua a una velocidad constante.
- c) En *semibatch exponencial* la alimentación del sustrato limitante se hace de forma exponencial, de la misma forma que el microorganismo crece de forma exponencial.
- d) En *semibatch optimizado* se busca hacer los ajustes necesarios para maximizar o minimizar funciones específicas de un microorganismo y donde se obtengan mejores rendimientos de un producto en específico, mediante pruebas de ensayo y error.

Las anteriores modalidades han sido desarrolladas para resolver problemas en específico de procesos biotecnológicos dado a que no todos los sistemas biológicos se comportan de la misma forma.

#### 4.8.2.2 Cultivo semibatch con control feedback.

Este tipo de operación se subdivide en dos categorías las cuales son:

- a) Semibatch con control feedback indirecto. En esta categoría se monitorean los factores asociados al crecimiento microbiano como pH, concentración de oxígeno, concentración de metabolito, coeficiente respiratoria, turbidez del medio de cultivo y presión parcial del  $\text{CO}_2$ .
- b) Semibatch con control feedback directo. En esta categoría el patrón de medición es la concentración de sustrato presente en el caldo de cultivo.

### **4.8.3 Cultivo continuo.**

El cultivo continuo se diferencia del cultivo por lotes en que el suministro de sustrato es agregado de manera continua al biorreactor, a la misma velocidad a la que se extrae producto. El crecimiento celular se mantiene en estado continuo de crecimiento balanceado (estado de crecimiento celular en el cual la composición interna de la célula no cambia a pesar de los cambios en la composición del medio) sin depender de los cambios de concentración del medio de cultivo como ocurre en el cultivo por lotes.

El cultivo continuo es aplicado en algunas industrias tales como destilerías, en la producción de levadura de panadería y tratamientos de residuos. El cultivo continuo es posible ya que de la misma forma que se extrae cierta cantidad del medio de cultivo de forma continua, las concentraciones celulares se regeneran por el crecimiento celular.

El cultivo continuo presenta diferentes modalidades como se muestra en la clasificación al inicio del capítulo. Sin embargo las más estudiadas y que tienen un mayor uso son el quimiostato y turbidostato. El término quimiostato se refiere a un tanque biorreactor continuo agitado, en el cual se mantiene constante el volumen del medio de cultivo, manteniendo una velocidad de dilución constante con sus respectivas concentraciones, mientras que en el turbidostato el volumen del caldo de cultivo también permanece constante solo que en esta modalidad, se trata de mantener constante la concentración de biomasa.

En la operación de un reactor continuo, la cantidad de material que se puede procesar está representado por el flujo másico  $F$ . La rentabilidad de un cultivo continuo se puede medir mediante parámetros de operación como el tiempo de residencia y la velocidad de dilución, como se representa en la siguiente ecuación:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$t_r = \frac{1}{D} = \frac{V}{F} \quad (4.19)$$

Donde:

$D$  = velocidad de dilución que representa el número de volúmenes de medio que pasa a través del reactor por hora.

$t_r$  = tiempo de residencia.

Visto desde el punto de vista económico, entre menor sea el valor de  $t_r$ , los costos serán mucho menores, lo cual significa que una mayor cantidad de producto será obtenido.

Las ecuaciones básicas que rigen el comportamiento del quimiostato se obtienen mediante un balance de materia, en estado estacionario:

$$FX_1 - FX + \mu XV - k_d XV = 0 \quad (4.20)$$

Donde  $F$  es el flujo másico de la corriente de entrada, la cual es igual a la salida de producto.

Considerando que la muerte celular es despreciable respecto a la velocidad específica de crecimiento y que la concentración de células en la corriente de entrada no existe ( $X_1 = 0$ ) en la ecuación (4.20), y retomando la definición de la velocidad de dilución  $D$  se tiene que:

$$\mu = D \quad (4.21)$$

Si a esta regla aplicamos la ecuación de Monod la obtendremos entonces la relación existente entre la velocidad de dilución y la concentración de sustrato.

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} \quad (4.22)$$

Si resolvemos de la misma forma un balance de materia en el reactor para el sustrato limitante en estado estacionario y con formación de producto no asociado al crecimiento, la relación entre la velocidad de dilución y la concentración de biomasa será:

$$FS_1 - FS + \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{Y_{PS}} + m_s \right) XV = 0 \quad (4.23)$$

Despejando la concentración de biomasa se tiene que:

$$X = \frac{D(S_1 - S)}{\left( \frac{D}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{Y_{XS}} + m_s \right)} \quad (4.24)$$

Cuando no existe formación de producto asociado al crecimiento y las funciones de mantenimiento celulares son despreciables, la ecuación (4.24) se simplifica a:

$$X = \left[ S_1 - \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} \right] Y_{XS} \quad (4.25)$$

La relación existente entre la velocidad de dilución y la formación de producto se obtiene realizando el balance de materia en el reactor para la formación de producto en estado estacionario de la siguiente manera:

$$FP_1 - FP + Q_p XV = 0 \quad (4.26)$$

Despejando la concentración de producto:

$$P = P_1 + \frac{Q_p X}{D} \quad (4.27)$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Donde  $Q_p$  depende del tipo de cinética de formación de producto o bien de datos experimentales.

Existe una tasa de dilución mínima a la cual ocurre la eliminación total de células en el reactor, llamada tasa de dilución crítica  $D_{crit}$ , en la práctica es aproximadamente igual a  $\mu_{max}$ . En el cultivo continuo es recomendable trabajar a velocidades de dilución por debajo de la tasa de dilución crítica ya que si existen fluctuaciones en el flujo de alimentación los cambios en concentración de biomasa y sustrato no cambia tan bruscamente (fig. 4.11).

La productividad de biomasa se define como:

$$Q_x = DY_{xS} \left[ S_i - \frac{K_x D}{\mu_{max} - D} \right] \quad (4.28)$$

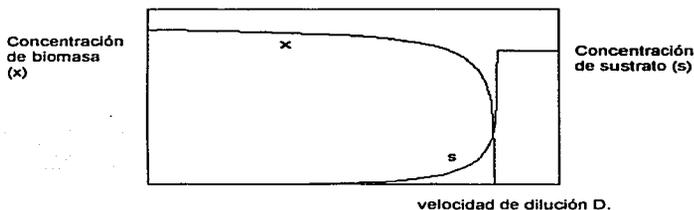


Fig. 4.11 Dependencia de la concentración de biomasa en función de la velocidad de dilución. [52]

La ecuación (4.27) sólo es válida cuando la formación de producto está asociada de forma directa al crecimiento y cuando los efectos de mantenimiento son despreciables. Interpretado de otra forma la productividad de biomasa, se considera como la cantidad de producto que sale del biorreactor por unidad de

tiempo. Como se muestra en la fig. 4.12, se puede tener un valor óptimo en la velocidad de dilución a la cual se tenga la mayor productividad, sin embargo en la practica  $D_{opt} \approx D_{crit}$ , por lo cual pueda ser riesgoso trabajar bajo estas condiciones.

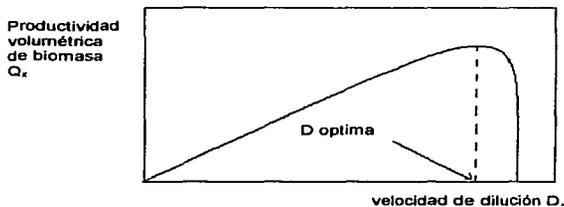


Fig. 4.12 Productividad volumétrica de biomasa respecto a la velocidad de dilución. [9]

La tasa de dilución óptima se puede obtener por la derivación de la ecuación (4.27) con respecto a D e igualando a cero se obtiene que:

$$D_{opt} = \mu_{max} \left( 1 - \frac{K_s}{K_s + S_i} \right) \quad (4.29)$$

La ecuación (4.28) es aplicada cuando la formación de producto está asociado al crecimiento y las necesidades de mantenimiento son despreciables. La velocidad de dilución critica se puede calcular a partir de la ecuación (4.25), igualando la concentración de biomasa a cero de manera que:

$$D_{crit} = \frac{\mu_{max} S_i}{K_s + S_i} \quad (4.30)$$

#### **4.8.4 Comparación entre cultivo batch y cultivo continuo.**

##### *a) Ventajas del cultivo continuo sobre el cultivo batch.*

- La rapidez de crecimiento se puede controlar y mantener mediante la adición de sustrato limitante.
- Se puede optimizar la composición del medio mediante pruebas de ensayo y error.
- Determina los parámetros cinéticos de una forma más precisa.
- Se puede mantener la producción de metabolitos secundarios durante el crecimiento celular.
- Se pueden obtener mayores productividades por unidad de volumen y menor pérdida de tiempo en tiempo improductivo como en operaciones de limpieza y preparación y esterilización del medio de cultivo así como del reactor.
- Se puede mantener una mezcla de cultivos sin tener el riesgo de que un microorganismo se desarrolle más que otro.

##### *b) Desventajas del cultivo continuo comparado con el cultivo batch.*

- No siempre se puede lograr la producción de algunos productos no asociados al crecimiento.
- La acumulación de células en las paredes del quimiostato pueden ocasionar fluctuaciones en el régimen permanente del cultivo continuo.
- Es difícil la aplicación de procesos continuos a cultivos los cuales aumentan la viscosidad del medio y complican a que se lleve el régimen permanente.
- El crecimiento por periodos largos puede generar problemas de contaminación.
- Es importante tener equipo auxiliar que asegure la continuidad del proceso.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPITULO II: FENOMENOS DE TRANSPORTE

### 5. FENÓMENOS DE TRANSPORTE EN EL PROCESO MICROBIANO.

En el diseño de reactores, es indispensable tener en cuenta los factores que afectan la transferencia de masa, y que pueden alterar la conversión de sustratos en productos. Los nutrientes se pueden presentar en formas sólidas, líquidas y gaseosas, por tal motivo, encontramos las siguientes situaciones de transferencia de masa:

- Transferencia de materia líquido - sólido.
- Transferencia de materia líquido - líquido.
- Transferencia de materia gas - líquido.

Para poder explicar el transporte de materia, normalmente se recurre a la teoría de la capa límite difusional, la cual se basa en la idea de que en la zona de contacto entre las fases, se forma una película de fluido o capa límite de transferencia de materia, pese a la turbulencia que se presente entre ambos fluidos. En la interface el proceso de transferencia de materia se lleva a cabo por difusión molecular.

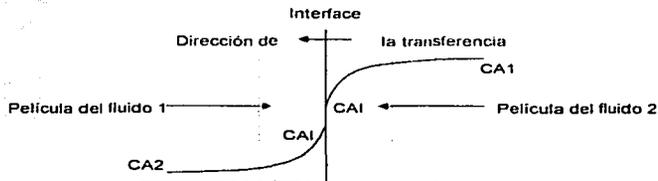


Fig. 5.1 Representación esquemática de la teoría de la película. La diferencia de concentraciones se presenta a lo largo de la película de fluido. [Perry 1992]

### **5.1 Justificación del tipo de bioreactor y modo de operación seleccionado.**

Para la producción de  $\alpha$  amilasa, se requiere de una fermentación aireada, donde el oxígeno es un nutriente indispensable para el crecimiento celular. Por tal motivo, se requiere de un sistema que agilice la transferencia del oxígeno por medios convectivos, desde la burbuja de aire, hasta el punto activo de reacción de las células. El uso de bioreactores agitados mecánicamente son de los más usados para cumplir con este objetivo [58]. El uso de bioreactores de tanque agitado, está limitado en función de los esfuerzos de corte sobre el microorganismo, provocado por el tipo de agitador. Para el caso de *Bacillus licheniformis*, este no es un problema, ya que es resistente hasta velocidades de rotación de 500 RPM a escala laboratorio [57]. El tipo de agitador usado para la dispersión del oxígeno dentro del medio de cultivo, el más recomendable es el de turbina o de Rushton de 6 hojas [58].

Respecto al modo de operación; es bien sabido que la formación de enzima  $\alpha$  amilasa se presenta en la etapa de crecimiento exponencial, por lo cual un cultivo continuo sería ideal de operar. Sin embargo, dado a las desventajas que se presenta el cultivo continuo sobre el cultivo batch (apartado 6.8.4), se optó por la operación en cultivo batch. Aunado a esto, algunas cepas mejoradas de *Bacillus licheniformis*, no presentan inhibición de la enzima  $\alpha$  amilasa por represión de su principal catabolito: la glucosa.

### **5.2 Transferencia de materia gas - líquido.**

Para sistemas aerobios, es indispensable el suministro de oxígeno, presente en el aire. Como es sabido, el aire es un componente poco soluble en soluciones acuosas, lo cual lo convierte en un nutriente limitante para el metabolismo microbiano.

La velocidad de transferencia de materia se representa por la siguiente ecuación:

$$N_A = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (5.1)$$

Donde:  $N_A$  = velocidad de transferencia del oxígeno del gas al líquido.  
 $C_{AL}^*$  = solubilidad del oxígeno en el caldo de cultivo.  
 $C_{AL}$  = concentración del oxígeno en el seno del líquido.  
 $k_L$  = coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida.  
 $a$  = área superficial disponible.

La solubilidad del oxígeno en soluciones acuosas a temperatura y presión ambiente es solo, aproximadamente, de 10 ppm. Esta cantidad de oxígeno es rápidamente consumida en los cultivos aeróbicos y debe ser renovada constantemente mediante la inyección de gas. Esto no es fácil de conseguir debido a la baja solubilidad del oxígeno, lo que hace que la diferencia de concentración ( $C_{AL}^* - C_{AL}$ ) sea siempre muy pequeña.

### 5.3 Factores que afectan la demanda de oxígeno celular.

La velocidad a la que las células consumen oxígeno en los fermentadores determina la velocidad a que este debe transferirse desde el gas al líquido. Muchos son los factores que influyen en la demanda de oxígeno, siendo los más importantes la especie celular utilizada, la fase de crecimiento del cultivo y la naturaleza de la fuente de carbono en el medio. En cultivos discontinuos la velocidad de consumo de oxígeno es proporcional al número de células presentes. La velocidad de consumo de oxígeno está representada por la ecuación siguiente:

$$Q_o = q_o x \quad (5.2)$$

Donde:

$Q_o$  = velocidad de consumo de oxígeno (g/lts).

$q_o$  = demanda o toma de oxígeno por el microorganismo (g/glt).

$x$  = concentración de células.

La demanda de oxígeno de un organismo ( $q_o$ ) depende en primer lugar de la naturaleza bioquímica de la célula y de su medio ambiente nutricional. Sin embargo cuando el nivel de oxígeno disuelto en el medio se sitúa por debajo de un cierto nivel, la velocidad de consumo de oxígeno depende también de la concentración de oxígeno en el líquido. Debido a la baja solubilidad del oxígeno, el oxígeno gaseoso, generalmente en la forma de aire, libre de microorganismos no deseados, debe ser suministrado continuamente al medio de fermentación y dispersado de tal forma que la velocidad de toma de oxígeno por el sistema iguale al menos a la velocidad de consumo de oxígeno por las células. Los experimentos muestran como la velocidad de captación de oxígeno es generalmente independiente de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo de un gran rango de concentraciones hasta un valor crítico. Por debajo de esta concentración crítica de oxígeno disuelto, el descenso en la velocidad de toma, sigue un patrón hiperbólico compatible con la cinética de Michaelis-Menten, tal como se muestra en la fig. 5.2.

Si  $C_{AL}$  es superior a la concentración de oxígeno crítica  $C_{crit.}$ ,  $q_o$  es una constante, máxima e independiente de  $C_{AL}$ . Para eliminar las limitaciones de falta de oxígeno y permitir al metabolismo celular funcionar a su mayor velocidad, la concentración de oxígeno disuelto en cada punto del fermentador debe ser superior a la crítica  $C_{crit.}$

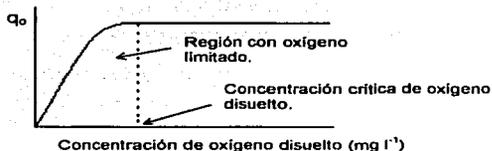


Fig. 5.2 Relación entre velocidad de toma de oxígeno y concentración de oxígeno disuelto. [52]

Para células con relativamente altos niveles de  $C_{crit}$ , el hecho de transferir suficiente oxígeno como para mantener  $C_{AL} > C_{crit}$  es siempre más difícil que para cultivos con valores bajos de  $C_{crit}$ . Las velocidades de demanda de oxígeno son mayores cuando se utiliza glucosa ya que la glucosa se consume más rápidamente que otros azúcares o substratos que contienen carbono.

#### 5.4 Factores que afectan la transferencia de oxígeno en el medio de fermentación.

##### 5.4.1 Transferencia de oxígeno desde las burbujas de gas a las células.

En las fermentaciones aeróbicas, las moléculas de oxígeno deben superar una serie de resistencias al transporte antes de poder ser utilizadas por las células.

1. Transferencia desde el interior de la burbuja hasta la interface gas - líquido.
2. Movimiento a través de la interface gas - líquido.
3. Difusión a través de la película líquida relativamente inmóvil que rodea la burbuja.
4. Transporte a través del seno del fluido.
5. Difusión a través de la película líquida relativamente inmóvil que rodea las células.
6. Movimiento a través de la interface líquido - célula.

7. Si las células están en floculo, agregado o partícula sólida, difusión a través del sólido hasta cada célula individual.
8. Transporte a través del citoplasma hasta el lugar de reacción.



Fig. 5.3 Transferencia de oxígeno desde las burbujas hasta el sitio de reacción. [28]

En este caso se ha supuesto que la resistencia en la película de líquido sea superior a la transferencia de materia gas - líquido. El valor relativo de las diferentes resistencias a la transferencia de materia depende de la composición y propiedades reológicas del líquido, de la intensidad de la mezcla, del tamaño de las burbujas, del tamaño del agregado de células, de las características de adsorción en la interface y de otros factores [25].

Para la mayoría de los biorreactores es valido el siguiente análisis.

1. La transferencia a través del seno de la fase gaseosa en las burbujas es relativamente rápida.
2. La interface gas-líquido constituye una resistencia despreciable.
3. La película líquida alrededor de las burbujas es una resistencia importante a la transferencia de oxígeno.
4. En caldos de fermentación viscosos puede ser difícil alcanzar una mezcla rápida. Si esto ocurre, la resistencia a la transferencia de oxígeno en el seno del líquido puede ser importante.

5. Si las células forman grandes agregados, la resistencia en la película líquida puede ser importante.
6. La resistencia en la interface célula - líquido es generalmente despreciable.
7. Cuando las células se encuentran en forma de agregados, la resistencia en el interior de las partículas es importante, ya que el oxígeno tiende a difundir a través del flóculo para alcanzar el interior de la célula. La magnitud de la resistencia depende del tamaño del agregado.
8. La resistencia intracelular a la transferencia de oxígeno es despreciable debido a las pequeñas distancias existentes.

Cuando las células se encuentran dispersas en el líquido y el caldo de fermentación se encuentra en mezcla perfecta, la mayor resistencia a la transferencia de oxígeno corresponde a la película líquida que rodea las burbujas de gas. El transporte a través de esta película llega a ser la etapa limitante del proceso y controla la velocidad global de transferencia de materia. En el estado estacionario no puede existir acumulación de oxígeno en ningún lugar del fermentador, por lo que la velocidad de transferencia de oxígeno desde las burbujas debe ser igual a la velocidad de consumo de oxígeno por las células, por lo que se tiene que:

$$k_L a(C_{AL}^* - C_{AL}) = q_o \cdot x \quad (5.5)$$

La ecuación anterior puede utilizarse para deducir alguna relación importante en los fermentadores de tanque agitado. De esta manera puede calcularse la concentración máxima de células que puede soportar el sistema de transferencia de oxígeno del fermentador.

$$x_{max} = \frac{k_L a C_{AL}^*}{q_o} \quad (5.6)$$

La comparación de los valores de  $x_{max}$  obtenidos puede utilizarse como indicador de la efectividad relativa de la transferencia de materia en las fermentaciones aerobias. Otro parámetro importante es el mínimo  $k_{LA}$  necesario para mantener  $C_{AL} > C_{crit}$  en el fermentador [21]. Esto puede calcularse a partir de la ecuación (5.6) como sigue:

$$(k_{LA})_{crit} = \frac{q_o \cdot x}{(C_{AL} - C_{crit})} \quad (5.7)$$

#### 5.4.2 Efecto de los solutos.

La presencia de solutos como sales, ácidos y azúcares presenta un importante efecto sobre la solubilidad del oxígeno en agua, por lo tanto la solubilidad del oxígeno disminuye al añadir iones y azúcares al medio de fermentación.

#### 5.4.3 Efecto de las burbujas.

La velocidad de transferencia de oxígeno en los caldos de fermentación se ve afectada por varios factores físicos y químicos que varían el valor de  $k_L$  o el de  $a$ , o de la fuerza impulsora de transferencia de materia ( $C_{AL} - C_{AL}$ ). El valor de  $k_L a$  en los líquidos de fermentación tiene un valor aproximado de  $3-4 \times 10^{-4} \text{ ms}^{-1}$  para burbujas mayores de 2-3 mm de diámetro. Este valor puede reducirse hasta  $1 \times 10^{-4} \text{ ms}^{-1}$  para burbujas de menor tamaño dependiendo de la rigidez de las mismas. Para burbujas de tamaño superior a 2-3 mm,  $k_L$  es relativamente constante e independiente de las condiciones. Si se necesita una mejora sustancial de las velocidades de transferencia de materia, es más efectivo centrar la atención en aumentar el área interfacial. El comportamiento de las burbujas afecta en gran medida el valor de  $k_L a$ . Algunas propiedades de las burbujas afectan el valor de  $k_L$ , mientras que otras varían el área interfacial  $a$ . Los fermentadores agitados se utilizan generalmente para cultivos aerobios. En estos recipientes, el oxígeno se suministra al medio mediante la creación de enjambres de burbujas de aire bajo

del rodete. El rodete provoca la dispersión de gas a través del resto del recipiente. En la mayoría de los recipientes agitados industriales las burbujas pasan una gran parte de su tiempo flotando libremente a través del líquido después de la dispersión inicial del rodete. El resultado es que prácticamente todos los reactores de tanque agitado a escala comercial operan en un régimen de libre ascenso de las burbujas. La propiedad más importante de las burbujas de aire en los fermentadores es su tamaño; la máxima área interfacial a se consigue si el gas se encuentra disperso en multitud de pequeñas burbujas. Por lo tanto el principal objetivo en el diseño de un biorreactor consiste en crear un alto nivel de dispersión de gas. Las burbujas pequeñas poseen velocidades de ascensión bajas, por lo que el tiempo de residencia en el líquido es mayor y disponen de más tiempo para que se disuelva el oxígeno. Las burbujas pequeñas crean, por lo tanto, elevados contenidos de gas, definidos como la fracción de volumen del fluido en el reactor ocupado por gas:

$$c = \frac{V_G}{V_L + V_G} \quad (5.8)$$

Donde:  $c$  = contenido de gas (hold-up)  
 $V_G$  = volumen de burbujas de gas en el reactor.  
 $V_L$  = volumen del líquido.

A pesar de que es aconsejable la formación de burbujas pequeñas, existen límites de tipo práctico. Burbujas con diámetros  $\ll 1\text{mm}$  pueden llegar a ser un inconveniente en los biorreactores ya que la concentración de oxígeno en estas burbujas se equilibra con la del medio en unos pocos segundos por lo que el contenido de gas no refleja la capacidad del sistema para la transferencia de materia, esto es todavía más preocupante en caldos no newtonianos viscosos donde las burbujas diminutas permanecen durante largos periodos de tiempo ya que su velocidad de ascensión disminuye [21]. Como regla general puede decirse que en los cultivos viscosos deben emplearse burbujas relativamente grandes. Si

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

las burbujas tienen tamaños de inferiores a 2-3 mm, los efectos de la tensión superficial dominan el comportamiento de la superficie de la burbuja. Una superficie de burbuja rígida da valores de  $k_L$  más bajos, por lo que puede concluirse que  $k_L$  disminuye conforme disminuye el diámetro de las burbujas por debajo de 2-3 mm. Sin embargo,  $k_L$  para burbujas menores de 3 mm disminuye por efectos de la superficie. Las burbujas muy pequeñas  $\ll$  1mm deben evitarse, especialmente con líquidos viscosos.

Entre los procesos físicos que determinan el tamaño de las burbujas se encuentran la misma formación de la burbuja, la dispersión del gas y la coalescencia. Las burbujas de aire se forman en el difusor o inyector. Algunos tipos de difusores son los de tuberías abiertas, los tubos perforados, los difusores porosos y los inyectores complejos de dos fases. Las burbujas que se forman en el difusor generalmente son de un tamaño relativamente uniforme y que depende del tipo de difusor utilizado. El intervalo de tamaño producido es un parámetro importante en el diseño de los fermentadores agitados por aire, como los burbujeadores y los de columna de aire ascendente. En los reactores agitados, el diseño del difusor y el mecanismo de formación de burbujas son de menor importancia en comparación con los efectos del rodete. Como resultado de un continuo proceso de rotura y dispersión de las burbujas por el rodete y la coalescencia debida a la coalición de las burbujas, el tamaño de las burbujas en los reactores agitados es muy diferente al formado inicialmente en el difusor. La coalescencia de las burbujas pequeñas es un proceso no deseado ya que reduce el área interfacial y el contenido de gas. La frecuencia de la coalescencia depende principalmente de las propiedades del líquido. Las sales impiden la coalescencia, por lo que los medios de fermentación son de alguna medida líquidos no coalescentes, siempre dependiendo de su composición.

Si la velocidad del agitador es baja y el caudal de gas alto, el gas envuelve el rodete sin dispersarse y la corriente de flujo se encuentra dominada por el aire ascendente alrededor del eje del agitador. En estos casos se dice que existe

inundación del rodete. A mayores velocidades del agitador empiezan a aparecer pequeñas corrientes de recirculación. El gas en contacto con las palas del rodete tiende a disminuir el coeficiente de retardo o rozamiento agitado con el giro del rodete y la consiguiente disminución del consumo de potencia. En condiciones de operación típicas de los fermentadores, un aumento en la velocidad del agitador mejora el valor de  $k_L a$ , excepto a velocidades muy bajas de inyección de aire, un aumento en el caudal del gas produce generalmente un efecto muy pequeño sobre  $k_L a$ . Un aumento en el número de rodetes en el eje del agitador no mejora necesariamente  $k_L a$ , incluso aunque aumente la potencia utilizada. La cantidad de gas que pasa a través de los rodetes superiores es pequeña en comparación con el inferior, por lo que la dispersión adicional de gas no es significativa.

#### *5.4.4 Efecto de los agentes antiespumantes.*

La formación de espuma en los fermentadores es muy común, particularmente en los sistemas aerobios. La mayoría de los cultivos producen una gran variedad de agentes espumantes y de agentes estabilizantes de la espuma como las proteínas, polisacáridos y ácidos grasos. Una cantidad excesiva de espuma flotando sobre el fermentador proporciona una vía de acceso a los organismos contaminantes y produce un bloqueo en la salida de los gases. Los líquidos y células atrapadas en la espuma producen una reducción en el volumen del biorreactor y posiblemente las condiciones allí son desfavorables para la actividad metabólica. La adición de agentes antiespumantes especiales al medio es el método más común de reducir la creación de espuma en los fermentadores. Sin embargo los agentes antiespumantes afectan a la superficie química de las burbujas y su tendencia a coalescer por lo que presentan un marcado efecto sobre  $k_L a$ . La mayoría de los agentes antiespumantes son sustancias fuertemente reductoras de la tensión superficial. Una disminución en la tensión superficial disminuye el diámetro medio de las burbujas y produce por tanto, mayores valores de  $a$ . Sin embargo esto se contrarresta por una disminución en la movilidad de la interface gas-líquido, lo cual disminuye el valor de  $k_L a$ . Con el fin de mantener el

carácter no coalescente del medio y elevados valores de  $k_{La}$ , es preferible utilizar métodos mecánicos antes que químicos, ya que de esta manera no se alteran las propiedades del líquido. Los dispositivos mecánicos como los discos rotatorios de alta velocidad que giran en la superficie del recipiente y los centrifugos son válidos cuando la creación de espuma es moderada, con la desventaja de que estos dispositivos consumen grandes potencias para operar en reactores a escala comercial, además de tener capacidad limitada de destrucción de espuma en cultivos altamente espumantes. En muchos casos es inevitable la utilización de agentes antiespumantes de tipo químico.

#### *5.4.5 Efecto de la temperatura.*

La temperatura de las fermentaciones aerobias afecta tanto a la solubilidad del oxígeno  $C_{AL}^*$  como al coeficiente de transferencia de materia  $k_L$ . Un aumento de temperatura produce una disminución drástica de  $C_{AL}^*$  y, por tanto de la fuerza impulsora de la transferencia de materia ( $C_{AL}^* - C_{AL}$ ). Al mismo tiempo aumenta la difusividad del oxígeno en la película líquida que rodea a las burbujas, lo que produce aumento en  $k_L$ . Para temperaturas entre 10 y 40 °C, un aumento de la temperatura, supone un aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno. Por encima de los 40 °C, la solubilidad del oxígeno disminuye, de forma apreciable, por lo que influye negativamente sobre la fuerza impulsora y sobre la velocidad de transferencia de materia.

#### *5.4.6 Efecto de la presión de gas y presión parcial del oxígeno.*

La presión total del gas y la presión parcial del oxígeno utilizados para airear, los fermentadores afecta el valor de  $C_{AL}^*$  que se representa por medio de la ecuación de Henry.

$$P_{AG} = p_{rYAG} = HC_{AL}^* \quad (5.9)$$

Donde:  $y_{AG}$  = fracción mol del oxígeno en el gas.  
 $p_{AG}$  = presión parcial del oxígeno en el gas.  
 $p_T$  = presión total del gas.  
 $H$  = constante de Henry.

De la ecuación (5.9) se deduce que si se aumenta la presión parcial del oxígeno en el gas,  $C_{AL}^*$  aumentara de la misma forma que lo haría la fuerza impulsora ( $C_{AL}^* - C_{AL}$ ). Por tal razón en algunas fermentaciones, para aumentar la transferencia de materia se utiliza aire enriquecido con oxígeno o incluso oxígeno puro.

### **5.5 Correlaciones para el coeficiente de transferencia de materia.**

Existe una amplia literatura sobre correlaciones sobre  $k_L$ . El valor máximo de la fuerza impulsora ( $C_{AL}^* - C_{AL}$ ) esta limitada debido a la baja solubilidad del oxígeno en el caldo de cultivo. Por la tanto la velocidad de transferencia de masa gas - líquido esta determinada principalmente por el  $k_L$ .

La magnitud de  $k_L$  depende de:

- a) Difusividad del gas disuelto en el líquido.
- b) Agentes superficiales los cuales afectan las propiedades de la interface.
- c) La reología del caldo de cultivo.
- d) El tamaño de la burbuja.
- e) El régimen de flujo.

A causa de la complejidad de los sistemas involucrados, los análisis dimensionales son inevitables, por lo cual las correlaciones son expresadas en números adimensionales como [9]:

1. Número de Sherwood = transferencia total de materia/difusividad de cantidad de movimiento.

$$Sh = \frac{k_L d}{D_L} \quad (5.10)$$

2. Número de Schmidt = transferencia difusiva de materia/difusividad de la materia.

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_L} \quad (5.11)$$

3. Número de Grashof = fuerzas de gravitación/fuerzas de viscosidad.

$$Gr = \frac{d^3 \rho g \Delta \rho}{\mu} \quad (5.12)$$

4. Número de Reynolds = fuerzas de inercia/fuerzas de viscosidad.

$$Re = \frac{du \rho}{\mu} \quad (5.13)$$

5. Número de Peclet.

$$Pe = Re \cdot Sc = \frac{du}{D_L} \quad (5.14)$$

- Donde:  $d$  = diámetro de partícula.  
 $D_L$  = difusividad de la fase líquida  
 $u$  = velocidad de la masa.

En la práctica, la exactitud de las correlaciones aplicadas a los sistemas biológicos es generalmente pobre. La principal razón es que la transferencia de materia está fuertemente afectada por los aditivos presentes en el medio. Debido a que los líquidos de fermentación contienen cantidades variables de sustratos, productos, sales, agentes tensoactivos y células, la química de la superficie de las burbujas y, por tanto la transferencia de materia llega a ser muy compleja. La mayoría de las correlaciones existentes para calcular los coeficientes de oxígeno se determinan utilizando aire puro en agua y es difícil de corregir estas correlaciones para diferentes composiciones del líquido. La mayoría de los estudios de transferencia de oxígeno se han realizado en reactores agitados a escala de

laboratorio, los cuales se caracterizan por una elevada turbulencia en todo el recipiente. La fase gas se encuentra bien distribuida en los pequeños tanques agitados, por el contrario, la mayoría de las burbujas en los tanques agitados a escala industrial se encuentran en ascensión libre. El resultado es que debido a los diferentes regímenes hidrodinámicos existentes en los recipientes pequeños y grandes, las correlaciones para la transferencia de materia para tanques agitados obtenidas en laboratorio tienden a sobrestimar la capacidad de transferencia de los sistemas a escala comercial.

Una correlación ampliamente utilizada para tanques agitados relaciona  $k_L a$  directamente con la velocidad del gas y la potencia suministrada al agitador, la cual incluye todos los efectos de flujo y turbulencias sobre la dispersión de burbujas y la capa límite de transferencia de materia. Una expresión para fermentadores agitados que contenga medios no viscosos y no coalescentes es:

$$k_L a = 2.0 \times 10^{-3} \left( \frac{P}{V} \right)^{0.7} u_G^{0.2} \quad (5.15)$$

Donde  $u_G$  es la velocidad superficial del gas en m/s, la cual se define como el caudal volumétrico de gas dividido por el área transversal del fermentador. La mayoría de las correlaciones publicadas, (ecuación 5.15) no considera el comportamiento no newtoniano de muchos fluidos de cultivos, el efecto de los azúcares y de los agentes antiespumantes añadidos ni de la presencia de sólidos como pueden ser las células. Como el exponente de P en la ecuación (5.15) es también menor de la unidad, aumentos en  $k_L a$  por aumentar bien el caudal de aire o la potencia, llegarán a ser cada vez menos eficientes y más costosos. [9]

#### *5.5.1 Correlaciones de $k_L a$ para tanques agitados en sistemas no viscosos.*

Las correlaciones para tanques agitados con sistemas no viscosos se dividen en:

a) Para dispersiones coalescentes aire – agua.

$$k_L a = 0.025 \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.4} V_s^{0.5} \quad (5.16)$$

b) Para dispersiones no fusionantes aire – solución de electrolito.

$$k_L a = 0.018 \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.7} V_s^{0.3} \quad (5.17)$$

Estas correlaciones están determinadas en los intervalos de potencia de  $500 < P/V < 10000$  watts/m<sup>3</sup>. Estas son altas potencias y generalmente se aplica a pequeña escala, sobre algunos cientos de litros.

#### 5.5.2 Correlaciones de $k_L a$ para tanques agitados en sistemas viscosos.

Frecuentemente la correlación de  $k_L a$  para fluidos no newtonianos se da en la siguiente ecuación:

$$k_L a = \text{constante} \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0.33} V_s^{0.56} \quad (5.18)$$

Existen varias correlaciones para determinar  $k_L a$  donde la viscosidad del medio de cultivo depende del crecimiento celular y de los productos formados durante la reacción. Estas correlaciones se resumen en la tabla 5.1.

Debido a la dificultad existente para predecir  $k_L a$  en biorreactores mediante correlaciones existentes, los coeficientes de transferencia de materia para el oxígeno se determinan normalmente de manera experimental. En cualquier método que se utilice para medir  $k_L a$ , las condiciones de medida deben de ser lo más similares posibles a las existentes en el fermentador durante la operación.

Tabla 5.1 Correlaciones del coeficiente volumétrico de transferencia de masa en tanques agitados para medios no newtonianos y viscosos.

Referencia	Correlación	Ecuación
Perez and Sandall [10]	$\frac{k_L a d_i^2}{D_L} = 21.2 \left( \frac{d_i N \rho_1}{\mu_{ms}} \right)^{1.11} \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22} \left( \frac{V_0 V_1}{\sigma} \right)^{0.22} \left( \frac{\mu_{ms}}{\mu_{ms}} \right)^{0.27}$	9
Yagi and Yoshida [11]	$\frac{k_L a d_i^2}{D_L} = 0.06 \left( \frac{d_i^2 N \rho_1}{\mu_{ms}} \right)^{1.5} \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22} \left( \frac{\mu_{ms} V_0}{\sigma} \right)^{0.22} \left( \frac{d_i N^2}{g} \right)^{0.22} \left( \frac{N d_i}{V_0} \right)^{0.22} [1 + 2(NN^2)]^{0.27}$	10
Ranade and Ulbrecht [12]	$\frac{k_L a d_i^2}{D_L} = 2.5 \times 10^{-4} \left( \frac{d_i^2 N \rho_1}{\mu_{ms}} \right)^{1.2} \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22} \left( \frac{\mu_{ms}}{\mu_{ms}} \right)^{1.28} [1 + 100(NN^2)]^{0.27}$	11
Höcker et al. [13]	$\frac{k_L a V}{V} = 0.105 \left( \frac{F}{V \rho_1 (K \mu_{ms} / \rho_1)^{0.5}} \right)^{0.22} \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22}$	12
Nishikawa et al. [14]	$\frac{k_L a d_i^2}{D_L} = 0.115 \left( \frac{d_i^2 N \rho_1}{\mu_{ms}} \right)^{1.2} \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22} \left( \frac{\mu_{ms} V_0}{\sigma} \right)^{0.22} \left( \frac{d_i N^2}{g} \right)^{0.22} \left( \frac{N d_i}{V_0} \right)^{0.22} \left( \frac{D}{d_i} \right)^{0.22} \left( \frac{P_0 (V/V_0)^{0.22}}{N^2 d_i^2 \rho_1} \right)^{0.22} [1 + 2(NN^2)]^{0.27} + 0.112 \left( \frac{P_0 (V/V_0)^{0.22}}{N^2 d_i^2 \rho_1} \right)^{0.22} \left( \frac{V_0}{(gD)^{0.22}} \right) \left( \frac{d_i C F_0}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22} \left( \frac{g D^2 \rho_1}{\sigma} \right)^{0.22} \left( \frac{d_i D^2 \rho_1}{4 C V_0^2} \right)^{0.22} \left[ 1 + 0.18 \left( \frac{N d_i}{g} \right)^{0.22} \right]^{-1}$	13
Henzler [8]	$k_L a \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22} = K \left( \frac{P/V}{\rho_1 (K \mu_{ms} / \rho_1)^{0.5}} \right)^{0.22} \left( \frac{V_0}{\rho_1 \mu_{ms} (D_L)^{0.22}} \right)^{0.22}$	14
Obermosterer and Henzler [15]	$\frac{k_L a \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22}}{V_0 \left( \frac{\rho_1}{\rho_1} \right)^{0.22}} = B \left( \frac{P/V}{\rho_1 V_0 K} \right)^{0.22}$	15
Kawase and Moo-Young [16]	$k_L a = 0.675 D_L^{-1} \rho_1^{0.22} (P/V)^{0.22} (g)^{0.22} (D_L)^{0.22} \left( \frac{V_0}{\mu_{ms}} \right)^{0.22} \left( \frac{\mu_{ms}}{\rho_1 D_L} \right)^{0.22}$	16
Oguti and Hatch [17]	$\frac{k_L a}{N} = 0.07 N g \left( \frac{d_i^2 N \rho_1}{\mu_{ms}} \right)^{0.22} \left( \frac{\rho_1 N^2 d_i^2}{\sigma} \right)^{0.22} \left( \frac{N d_i}{V_0} \right)^{0.22}$	17

Asenjo (1995)

## 5.6 Mezclado y potencia de agitación.

### 5.6.1 Mezclado.

Las funciones del mezclado son las siguientes:

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- a) Dispersión de los nutrientes en el caldo de cultivo.
- b) Dispersión de los gases como el aire cuando atraviesa el medio de cultivo en forma de pequeñas burbujas.
- c) La suspensión de las partículas sólidas como las células.
- d) Mejorar la transferencia de calor hacia o desde el medio de cultivo.

La parte principal en el mezclado se encuentra en el tipo de agitador y del flujo que produce. La selección del tipo de agitador depende del tipo de fluido a mezclar, de la sensibilidad del sistema a la cizalla mecánica y a las demandas de transferencia de oxígeno. La fig. 5.2 muestra los intervalos de viscosidad para diferentes agitadores.

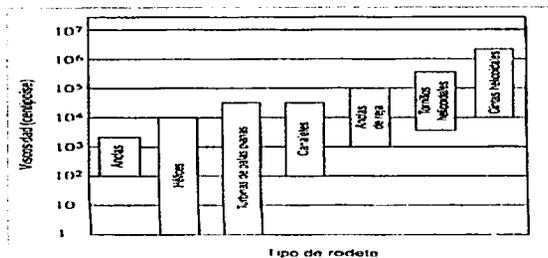


Fig. 5.2 Intervalos de viscosidad para diferentes agitadores. [21]

Existen diferentes configuraciones de agitadores (fig. 5.3) con diferentes funciones:

- a) *Agitadores de flujo radial.* Los agitadores de flujo radial crean corrientes que fluyen desde el agitador hacia las paredes del tanque como se observa en la fig. 5.4a. Los agitadores de canaleta y de turbina, específicamente el de diseño

de hojas planas, se usan a menudo para operaciones de transferencia de masa. [58] Comúnmente las relaciones de diámetro del impulsor ( $d_i$ ) respecto al diámetro del tanque ( $D_T$ ) es de 1:3.

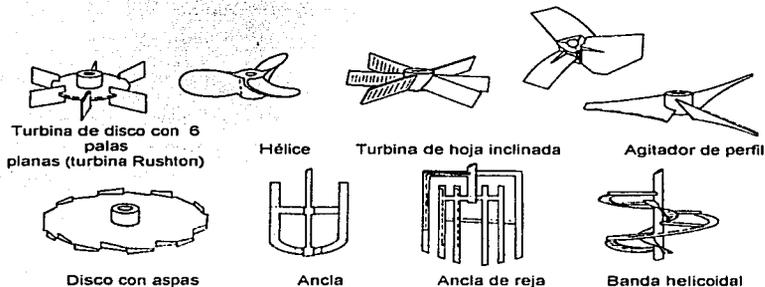


Fig. 5.3 Tipos de agitadores. [5]

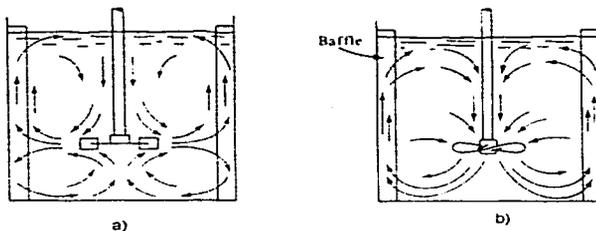


Fig. 5.4 Tipos de flujo para a) agitadores de flujo radial, b) agitadores de flujo axial en tanques con deflectores. [28]

b) Agitadores de flujo axial. Estos agitadores crean corrientes de flujo desde el agitador hasta el fondo del biorreactor. Fig. 5.4 b. Agitadores de hojas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inclinadas y de hélice son ejemplos de agitadores que producen este tipo de flujo. Estos, se utilizan con más frecuencia para operaciones de mezclado que para transferencia de masa. Las relaciones de  $d/D_T$  son de 1: 5 o menos. [58]

Para que exista una mezcla eficaz con un solo agitador, la profundidad del líquido en el tanque, no debe ser superior a 1.0 – 1.25 veces el diámetro del mismo. [21] En una mezcla es indispensable crear un flujo turbulento que facilite la transferencia de masa, fomentando la creación de remolinos lo más pequeños posibles. El uso de placas deflectoras o baffles, contribuye al aumento de transferencia de masa, eliminando la formación de vórtices. La anchura óptima de los deflectores depende del diseño del rodete y de la viscosidad del fluido; pero este fluctúa en el orden de  $1/10$  –  $1/12$  el diámetro del tanque. Los deflectores se colocan de forma perpendicular separados de la pared del biorreactor con longitudes de  $1/50$  el diámetro del tanque.

#### 5.6.2 Potencia de agitación para fluidos newtonianos no aereados

Los requerimientos de potencia para fluidos newtonianos no aereados se caracteriza por las dimensiones del número de potencia ( $N_p$ ), el cual se define como la relación entre fuerzas externas y las fuerza inerciales ejercidas por el fluido.

$$N_p = \frac{P}{N^3 D_i^5 \rho} \quad (5.17)$$

Donde:

- P = potencia ejercida por el agitador
- N = velocidad rotacional del agitador.
- $D_i$  = diámetro del agitador
- $\rho$  = densidad del fluido.

El número de potencia se relaciona con el número de Reynolds del agitador ( $Re_i$ ) el cual se define como:

$$Re_i = \frac{ND_i^2 \rho}{\mu} \quad (5.18)$$

Estas ecuaciones son aplicables para recipientes geoméricamente similares. La gráfica del  $N_p$  en función del  $Re_i$  en coordenadas logarítmicas log - log, es conocida como la curva de potencia y es construida por la obtención de datos experimentales. La correlación entre  $N_p$  y  $Re_i$  para diferentes agitadores se muestra en la fig. 5.5.

De la fig. 5.5 se identifican tres regiones de flujo:

- a) Región de flujo laminar donde  $Re_i < 10$ . Para los agitadores de ancla y helicoidal, el flujo laminar se puede prolongar hasta  $Re_i = 100$  o mas.

$$N_p = \frac{k_1}{Re_i} \quad (5.19)$$

De la ecuación (5.19) se obtiene entonces:

$$P = k_1 \mu N_p^2 D_i^3 \quad (5.20)$$

Donde  $k_1$  = constante de proporcionalidad. La tabla 5.4 presenta algunos valores de  $k_1$  para diferentes agitadores.

- b) Región de flujo turbulento donde  $Re_i > 10^3$ . El número de potencia en el flujo turbulento es independiente del número de Reynolds por lo cual:

$$N_p = k_2 \quad (5.21)$$

Donde **K** es un valor constante del número de potencia en el flujo turbulento que depende del tipo de agitador. La potencia consumida será:

$$P = k_2 \rho N_i^3 D_i^5 \quad (5.22)$$

**Tabla 5.4 Algunos valores de  $k_1$  y  $k_2$**

Tipo de agitador	$k_1$	$K_2$
	( $Re_i = 1$ )	( $Re_i = 10^5$ )
Turbina de Rushton	70	5-6
Canalete	35	2
Hélice marina	40	0.35
Ancla	420	0.53
Banda helicoidal	1000	0.35

Doran 1995

La fig. 5.5 es válida para sistemas con un solo agitador además de que se limita para relaciones específicas. Es posible aplicar las siguientes ecuaciones para estimar la potencia consumida por tres diferentes tipos de impulsor, los cuales son los más comúnmente encontrados en fermentadores bajo condiciones de flujo turbulento. [5]

- a) Para turbinas de 6 hojas.

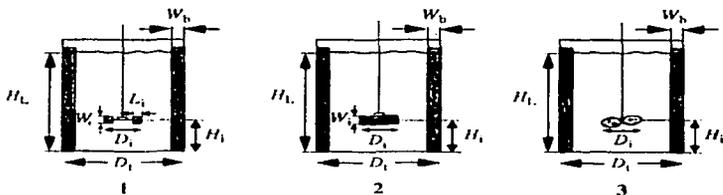
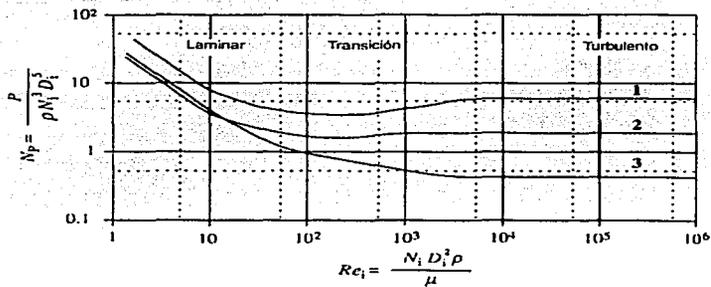
$$N_P = 0.035 \rho N_i^3 D_i^3 W B^0 R^0 J^{0.3} \quad (5.23)$$

- b) Para turbinas de canaleta.

$$N_P = 0.0085 \rho N_i^3 D_i^3 W B^0 R^0 J^{0.3} \quad (5.24)$$

- c) Para turbinas de disco.

$$N_P = 0.25 \rho N_i^3 D_i^2 L^{1.5} W B^0 R^0 J^{0.3} \quad (5.25)$$



Modelo	$D_i / D_t$	$H_t / D_t$	$H_i / D_t$	Placas deflectoras	
				$W_b / D_t$	Número
1. Turbina flushon $W_{D_i} = 0.2, L_{D_i} = 0.25$	3	3	1	0.1	4
2. Curvilinea $W_{D_i} = 0.25$	3	3	1	0.1	4
3. Helice marina Anchura = $D_i$	3	3	1	0.1	4

Fig. 5.5 Correlación entre el número de potencia y el número de Re, en un sistema no aireado. [21]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Donde:  $W$  = ancho de la hoja del agitador.  
 $L$  = largo de la hoja del agitador.  
 $B$  = número de hojas del agitador.  
 $R$  = número de deflectores.  
 $J$  = ancho del deflector.

Si en el sistema se encuentran mas de un impulsor, su distribución puede tener la siguiente relación:

$$D_i < H_i < 2D_i \quad (5.26)$$

El número de impulsores será:

$$\frac{H_L - 2D_i}{D_i} < N_a < \frac{H_L - D_i}{D_i} \quad (5.27)$$

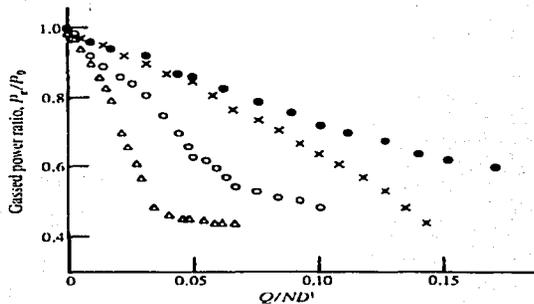
Donde:  $H_i$  = espacio entre los agitadores.  
 $H_L$  = altura del líquido en el recipiente.  
 $N_a$  = número de agitadores.

Cuando se tiene más de dos agitadores la potencia consumida en conjunto será:

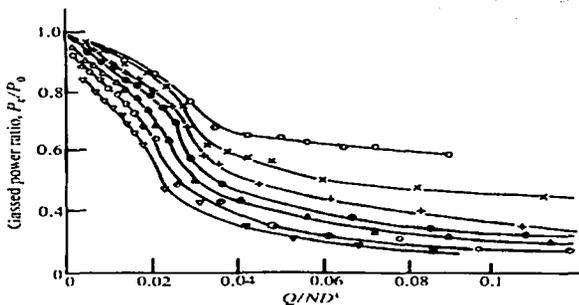
$$P = n(P)_1 \quad (5.28)$$

Donde:  $n$  = número de agitadores.  
 $(P)_1$  = potencia consumida por un solo agitador.

El efecto de la cantidad de hojas presentes en el agitador y de la velocidad de rotación sobre la relación  $P_g/P$  se muestra en la figura 5.6a y 5.6b.



a)



b)

Fig. 5.6 a) Efecto del número de hojas en agitador ( $n$ ) sobre la potencia de agitación.  $\Delta$ ,  $n=6$ ,  $\circ$ ,  $n=9$ ,  $\times$ ,  $n=12$ . b) Efecto de la velocidad de agitación sobre la potencia de agitación.  $\circ$ ,  $N=2s^{-1}$ ,  $\times$ ,  $N=3s^{-1}$ ,  $+$ ,  $N=4s^{-1}$ ,  $\bullet$ ,  $N=5s^{-1}$ ,  $\bullet$ ,  $N=6s^{-1}$ ,  $\circ$ ,  $N=7s^{-1}$ ,  $\nabla$ ,  $N=8s^{-1}$ . [5]

### 5.6.3 Potencia de agitación para fluidos newtonianos aereados.

La aireación tiene un profundo efecto sobre el consumo de potencia, a causa de la presencia de burbujas de aire, particularmente en las cercanías del impulsor reduciendo la densidad de la mezcla gas/líquido. La aireación puede reducir el consumo de potencia tanto como un tercio del valor original. El consumo de potencia depende fuertemente de la formación de cavidades de gas. Dado a que este proceso es discontinuo y hasta cierto punto aleatorio, la reducción en el consumo de potencia es generalmente no uniforme.

Una de las ecuaciones mas usadas es la propuesta por Michel y Miller (1962), la cual predice la potencia con aireación ( $P_g$ ).

$$P_g = 0.72 \left( \frac{P^2 N D^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45} \quad (5.29)$$

Donde la Q es el flujo volumétrico, y la potencia está dada en watts. Esta correlación es aplicable también para líquidos que contengan arriba del 5% de sólidos suspendidos y para algunas mezclas líquido – líquido de líquidos orgánicos en agua. Existen correlaciones que involucran la relación  $P_g/P$  las cuales se resumen en la tabla 5.5

Tabla 5.5 Correlaciones para requerimientos de potencia con aireación.

Correlación	Escala	Observaciones	Referencias
$P_g = 0.72 \left( \frac{P_0^2 N D^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45}$	T = 0.3	La potencia de agitación sin aireación es independiente de la viscosidad para $0.9 < \mu < 100$ cP	Michel y Miller (1962)

Tabla 5.5 Continuación.

$\frac{P_g}{P_0} = 1 - 1.6 Q_{vvm} D^{0.63}$	T = 1.0	-	Pharamont (1975)
$\frac{P_g}{P_0} = \text{constant} \left( \frac{PN^2 D^3}{\sigma} \right)^{-0.25} \left( \frac{Q}{ND^3} \right)^{-0.38}$	T = 0.29	La constante depende de la geometría y las variaciones de las fuerzas iónicas.	Hassan y Robinson (1979)
$P_g = 0.83 \left( \frac{P_0^2 ND^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45}$	T = 0.22	Correlación modificada para sistemas con formación de espuma.	Loiseau (1977)
$\frac{P_g}{P_0} = 0.497 \left( \frac{\rho N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-0.18} \left( \frac{Q}{ND^3} \right)^{-0.38}$	T = 0.22	-	Luong y Volesky (1979)
$P_g = 0.812 \left( \frac{P_0^2 ND^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45}$	T = 0.4	-	Young (1979)
$N_{Pg} = \alpha N_p \exp(-\beta Q)$	T = 3.05	Las constantes $\alpha$ y $\beta$ dependen de la velocidad de aireación Q	Brown (1981)
$P_g = 1007 \left( \frac{N^{3.33} D^{6.33}}{(\eta Q)^{0.4}} \right)$	T = 0.2	$\eta$ es el factor de eficiencia de dispersión que depende del régimen de mezclado.	Greaves (1981)

Atkinson (1991)

Existen otras correlaciones que involucran la relación  $P_g/P$  en función del número de aireación ( $N_a$ ), donde:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$N_p = \frac{Q}{N_s D_s^3}$$

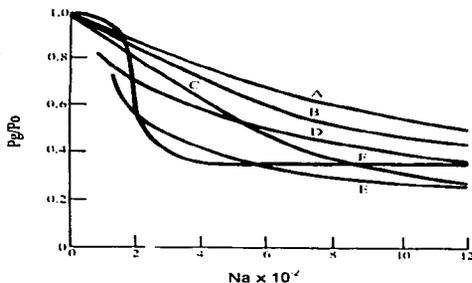


Fig. 5.6 Consumo de potencia para sistemas aerados con diferentes tipos de agitadores. A; turbina de hoja plana (B=8); B; disco con aspas (B=8); C; disco con aspas (B=6); D disco con aspas (B=16); E; disco con aspas (B=4); F; canaleta. B es el número de hojas o aspas. [1]

#### 5.6.4 Potencia de agitación para fluidos no newtonianos no aerados.

Para los fluidos no newtonianos los cuales dependen de las condiciones de cizalla, el número de Reynolds debe ser modificado ( $Re_i$ ) de modo que:

$$Re_i = \frac{N_s D_s^2 \rho}{\mu_{sp}} \quad (5.31)$$

Donde:  $\mu = K\dot{\gamma}^{n-1}$  para fluidos que obedecen la ley exponencial.

K = índice de consistencia.

La velocidad de corte  $\gamma$  puede ser calculada de la siguiente forma:

a) Para fluidos pseudoplásticos:

$$\gamma = kN_i \quad (5.32)$$

b) Para fluidos dilatantes:

$$\gamma = 12.8N_i \left( \frac{D_i}{D_T} \right)^{0.5} \quad (5.33)$$

Donde  $k$  = constante que depende de la geometría del agitador. La tabla 5.6 muestra algunos valores de  $k$  para diversos tipos de agitadores.

Tabla 5.6 Valores observados de  $k$  para la ecuación (10.32)

Tipo de agitador.	$k$
Turbina de Rushton	10-13
Canalete	10-13
Canalete de hojas curvas	7.1
Hélice	10
Ancla	20-25
Cinta helicoidal	30

Doran (1995)

En la fig. 5.7 se muestra la relación existente entre el  $N_p$  y el  $Re_i$  para una turbina Rushton de 6 hojas con una relación de  $D_i/D_T$  de 0.5, usando CMC a diferentes concentraciones como fluido modelo.

La relación entre para fluidos pseudoplásticos y dilatantes el  $N_p$  y el  $Re_i$  para una turbina Rushton de 6 hojas y canaleta, se muestran en las figuras 5.8a y 5.8b. [5]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

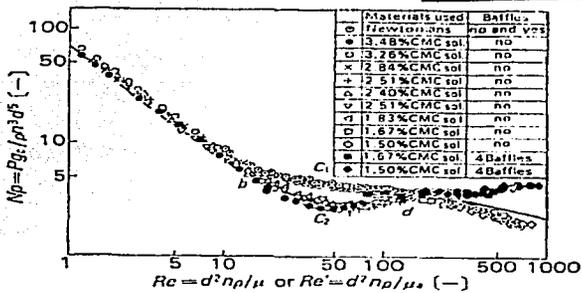


Fig. 5.7 Correlación entre el  $N_p$  y  $Re_i$  para fluidos pseudoplásticos. [31]

### 5.6.5 Potencia de agitación para fluidos no newtonianos aereados.

Es difícil encontrar información para fluidos no newtonianos en la misma medida que los fluidos newtonianos, debido a la diversidad de estos, y por la complejidad que implican los cambios de viscosidad a lo largo de un proceso de fermentación. Es por eso que para el diseño de un sistema en específico, se debe de realizar una experimentación previa, según las características del proceso global. Una aproximación generalizada, que puede usarse para conocer la potencia consumida es la expuesta por Hugmak, la cual establece que:

$$\frac{P_p}{P} = 0.1 \left( \frac{Q}{N_i V} \right)^{0.25} \left( \frac{N^2 D_i^4}{g W_i V^2} \right)^{0.20} \quad (5.34)$$

Donde:  $V$  = volumen del líquido.  
 $g$  = aceleración de la gravedad.  
 $W_i$  = ancho de la hoja del agitador.

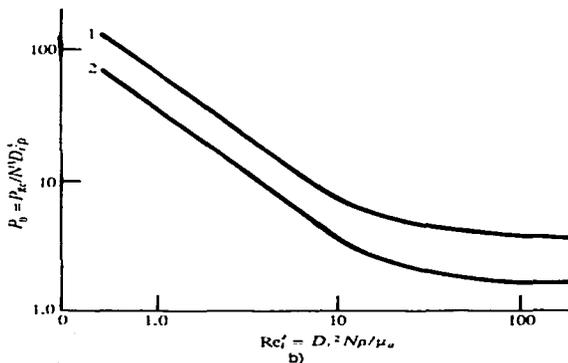
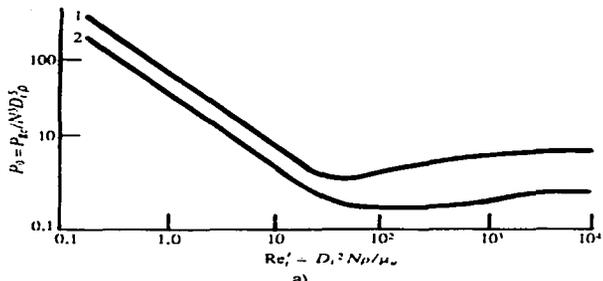


Fig. 5.8 Correlaciones entre el  $N_p$  y el  $Re'_1$ . a) Fluidos pseudoplásticos. b) Fluidos dilatantes. 1) Turbina Rushton. 2) Canaleta. [5]

La ecuación (5.34) muestra un promedio de desviación del 11% entre el  $P_0$  calculado y el experimental. [2]

### 5.6.6 Inundación.

Se le llama inundación del rodete, al hecho de que se formen cavidades de aire detrás de las hojas del agitador, a tal grado de que estas se prolonguen a lo largo del agitador completo. Es necesario evitar este fenómeno, ya que la transferencia de masa se ve disminuida, a tal grado que el agitador ya no es capaz de dispersar el aire adecuadamente dentro del medio de cultivo.

Las innovaciones tecnológicas en el campo de agitación han generado nuevos diseños de agitadores, los cuales son capaces de aumentar la transferencia de masa hasta un 60% mas que la turbina de Rushton. Estos nuevos diseños, también tienen la ventaja de soportar mas de 5 veces el flujo de aire antes de llegar a la inundación, comparado con la turbina tradicional. [18]

La figura 5.9 presenta el límite de inundación en función del número de aereación.

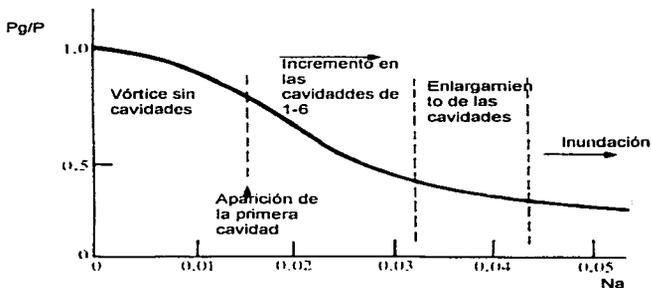


Fig. 5.9 Seguimiento y desarrollo de diferentes cavidades en relación a la potencia de agitación con aireación. [5]

## **5.7 Criterios de escalamiento para biorreactores.**

Se entiende por escalamiento, el reproducir los resultados en laboratorio a un sistema de escala industrial. Si la fermentación se efectúa de manera satisfactoria, todas las variables de operación son por lo tanto conocidas o pueden deducirse. Para alcanzar un crecimiento equivalente del microorganismos en una escala industrial, las condiciones de crecimiento observadas en laboratorio deben ser mantenidas constantes para el sistema industrial. La concentración de nutriente, la temperatura y pH pueden ser controladas de forma independiente.

Los métodos que pueden ser aplicados para realizar el cambio escala de un biorreactor son los siguientes [1,9]:

1. Cambio de escala basado en el aporte fijo de energía. (potencia por unidad de volumen).
2. Cambio de escala basado en el tiempo de mezclado.
3. Cambio de escala basado en el coeficiente de transferencia de masa.
4. Cambio de escala basado en condiciones ambientales fijas (por ejemplo concentración de oxígeno disuelto)
5. Cambio de escala basado en la velocidad lineal fija del impulsor.

La tabla 5.7 presenta los criterios empleados para el cambio de escala en tanques agitados mecánicamente y las relaciones entre las variables de operación y diseño. De acuerdo a la tabla 5 7, los mejores criterios para pasar de una escala a otra son, al parecer,  $P/V$  constante y  $k_{La}$  constante [43,48]. La práctica actual es tratar de mantener constante la transferencia de oxígeno, es decir  $k_{La}$ , así como la velocidad lineal del impulsor combinando la relación entre el impulsor y el diámetro del tanque [48]. La selección del método de escalamiento depende de la estabilidad de la formación de producto en función de las variables de operación.  $10^4$ ,  $N_p = cte$ ).

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.7 Diferentes criterios para cambios de escala en tanques geoméricamente similares, con medio y propiedades físicas constantes ( $N_{Re} >$

Criterio	Relación	Relación
Potencia por unidad de volumen constante	$P/V \propto (N^3 D^3)$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{1/3}$
Flujo proveniente del impulsor por unidad de volumen constante	$Q/V \propto N$	$\frac{P_1}{P_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^3$
Velocidad tangencial constante	$\pi ND = K'$	$\frac{N_1}{N_2} = \frac{D_1}{D_2}$
$N_{Re}$ similar	$N_{Re} \propto ND^2$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^2$
Tiempo de mezclado igual	$t = t_M N^{1/3} D^{1/3}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{1/3}$
$k_L$ constante	$k_{L2} \propto (ND)^{2\alpha-1}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{\frac{2\alpha-1}{\alpha}}$
$k_{L2}$ constante	$k_{L2} \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{3\alpha}$
$k_{L2}$ constante	$k_{L2} \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha V_s^{\beta}$	$\frac{N_1 \alpha_1}{N_2 \alpha_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{3\alpha} \left(\frac{D_2 \alpha_2}{D_1 \alpha_1}\right)^{\beta\alpha}$

$$\alpha \neq K \quad \beta = K$$

Quintero 1981

En un cultivo aerobio la velocidad de reacción es controlada por la velocidad de captación de oxígeno, por lo cual el escalamiento basado en el coeficiente de transferencia de masa es uno de los más aplicados.

Escalas fermentativas	Objetivo	Capacidad	Variables a medir
Cultivo a pequeña escala.	Determinar las características del desarrollo y producción de las células, mediante la medición de parámetros como la velocidad de crecimiento, la velocidad específica de formación de producto y el rendimiento de producto.	Frascos de 0.25 lt-1lt	- pH - Temperatura - Composición del medio.
Bioreactor a escala de pruebas.	Conocer si el reactor es capaz o no de proporcionar las condiciones óptimas de actividad celular y determinar la forma de operación, en la medida de poder calcular la fiabilidad económica del proceso	1-2 lt	- pH - Temperatura - Concentración de CO <sub>2</sub> disuelto - Vel. de agitación. - Vel. de aireación. - Formación de espuma. - Potencia - Análisis de los gases de entrada y salida. - Concentración celular. - Actividad enzimática.
Bioreactor a escala piloto.	Examinar la respuesta de las células al cambio de escala, específicamente con la pérdida o variación del rendimiento que suele producirse, con el fin de reajustar las proyecciones económicas.	0.1-1 m <sup>3</sup>	- El control general del proceso.
Bioreactor de escala	Diseño y pruebas generales del bioreactor y los equipos suplementarios.	5-400 m <sup>3</sup>	- El control general del proceso.

Owen (1989)

## 5.7.2 Secuencia de cálculo para el escalamiento de bioreactores de tanque agitado.

5.7.2.1 Metodología de escalamiento para biorreactores de tanque agitado usando  $k_L a$  como criterio de escalamiento. [2,31,33,36,37]

De las pruebas de laboratorio, establecer las siguientes características de acuerdo al mejor rendimiento en la formación de producto y biorreactor a escalar.

1. Velocidad del flujo de gas (vvm).
2. Velocidad de agitación (N).
3. Dimensiones del biorreactor.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- |  |           |
|--|-----------|
| a) Volumen total del fermentador                     | ( $V_T$ ) |
| b) Volumen de trabaja                                | (V)       |
| c) Diámetro del tanque                               | ( $D_T$ ) |
| d) Diámetro del impulsor                             | ( $D_i$ ) |
| e) Altura del líquido                                | ( $H_L$ ) |
| f) Altura del impulsor sobre la base del biorreactor | ( $H_i$ ) |
| g) Ancho de los baffles                              | ( $W_b$ ) |
| h) Ancho de las espas del impulsor                   | ( $W_i$ ) |

4. Rendimientos alcanzados.

- |   |              |
|---|--------------|
| a) Rendimiento de biomasa a partir de sustrato  | ( $Y_{XS}$ ) |
| b) Rendimiento de producto a partir de biomasa  | ( $Y_{PX}$ ) |
| c) Rendimiento de producto a partir de sustrato | ( $Y_{PS}$ ) |

5. Especificar las propiedades del medio de cultivo.

- a) Densidad  $(\rho)$
- b) Índice de consistencia  $(K)$
- c) Índice de comportamiento  $(n)$
- d) Difusividad del oxígeno en el medio de cultivo  $(D_{O_2})$
- e) Tensión superficial del medio  $(\sigma)$
- f) Tiempo de relajamiento  $(\lambda)$

6. Calcular

- a) El flujo volumétrico  $(Q)$

$$Q = \frac{\pi VVM D_i^2 H_L}{4} \quad (5.35)$$

Donde  $VVM$  es el volumen de líquido por volumen de aire por minuto.

- b) El número de aereación  $(Na)$

$$Na = \frac{Q}{ND_i^3} \quad (5.36)$$

- c) Velocidad superficial  $(Vs)$

$$Vs = \frac{4Q}{\pi D_i^2} \quad (5.37)$$

- d) Velocidad lineal del impulsor  $(V_{Li})$

$$V_{Li} = \pi ND_i \quad (5.38)$$

e) El número de Reynolds

$$Re = \frac{\rho D_i^2 N}{\mu_{ap}} \quad (5.39)$$

Donde  $\mu_{ap}$  para fluidos de la potencia está definido por:

$$\mu_{ap} = K\gamma^{-n-1} \quad (5.40)$$

Donde  $\gamma$  esta dada por:

$$\gamma = k_1 N \quad (5.41)$$

Donde  $k_1$  depende del tipo de agitador usado (tabla 5.2)

7. Calcular el número de potencia usando:

$$Np = \frac{P}{N^3 D_i^5} \quad (5.42)$$

O bien usando las ecuaciones 5.23-5.25.

8. Calcular la potencia consumida por unidad de volumen.

$$P = \frac{Np N^3 D_i^5}{g_c} \quad (5.43)$$

9. Calcular la potencia de agitación con aereación ( $P_g$ )

$$\frac{P_g}{P} = 0.1 \left( \frac{Q}{NV} \right)^{0.25} \left( \frac{N^2 D^4}{g W_i V^{2.3}} \right)^{-0.2} \quad (5.44)$$

10. Calcular el coeficiente volumétrico de transferencia de masa por:

a) Fluidos newtonianos

$$k_L a = c \left( \frac{P_g}{V} \right)^m V_s^n \quad (5.45)$$

Donde m y n toman valores dependiendo del volumen del bioreactor (tabla 5.6)

Tabla 5.8 Valores de m y n de acuerdo al volumen del bioreactor.

Volumen	Exponente	
Litros	m	N
5	0.95	0.7
50	0.6	0.7
50,000	0.4	0.5

Bullock (1991)

b) Fluidos no newtonianos.

$$k_L a \frac{D_L^2}{D_{O_2}} = 0.06 (Sc)^{0.5} (Re)^{1.5} (Fr)^{0.19} \left( \frac{\mu_{sp} V_s}{\sigma} \right)^{0.6} \left( \frac{ND_L}{V_s} \right)^{0.32} (1 + 2(N_L)^{12})^{-0.67} \quad (5.46)$$

Donde:

$$Sc = \frac{\mu_{sp}}{\rho D_{O_2}}$$

$$Re = \frac{\rho D_L^2 N}{\mu_{sp}}$$

$$Fr = \frac{D_L N^2}{g}$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cálculos de bioreactor a escala próxima.

11. Elegir el volumen requerido basado en el rendimiento y capacidad requerida.

a) Bioreactor de escala piloto.

Volumen: 0.1 - 1.0 m<sup>3</sup>

b) Bioreactor de escala productiva o industrial.

Volumen: 5 – 450 m<sup>3</sup>

12. Calcular las dimensiones basadas en las relaciones de similitud geométrica.

$$\left(\frac{D_i}{D_T}\right) = 0.3 \quad \left(\frac{H_L}{D_T}\right) = 1.0 \quad \left(\frac{H_i}{D_i}\right) = 1.0 \quad \left(\frac{W_b}{D_T}\right) = 0.1 \quad \left(\frac{W_i}{D_i}\right) = 0.2 \quad (5.47)$$

a) Calcular el diámetro del tanque.

$$D_T = \left(\frac{4}{\pi} V\right)^{1/3}$$

b) Calcular el diámetro del impulsor.

$$D_i = 0.3 D_T$$

c) Calcular la distancia del agitador sobre la superficie del tanque.

$$H_i = D_i$$

- d) Calcular el espesor de los baffles (4 baffles)

$$W_b = 0.1 D_T$$

- e) Calcular el ancho de las aspas del agitador

$$W_s = 0.2D_i$$

13. Establecer el criterio de escalamiento.

$$k_{LA} \text{ laboratorio} = k_{LA} \text{ escala próxima} \quad (5.48)$$

14. Elegir la segunda ecuación para el cálculo de Q y N

⇒ Método 1, usando:

- a) Número de aereación constante.
- b) Velocidad superficial constante.
- c) Volumen de gas por volumen de líquido constante

- 14.1a Si se calcula Q directamente de los incisos b) o c). El calculo de N será:

- Fluidos no newtonianos

Se proponen valores de N hasta llegar a la igualdad (5.48), mediante la ecuación (5.46)

- Fluidos newtonianos

- a) Se calcula N del criterio de escalamiento (P/V) constante (cuando se trabaje bajo condiciones turbulentas).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$\frac{N_1}{N_2} = \left( \frac{D_1}{D_2} \right)^{2/3} \quad (5.49)$$

- b) Se propone un valor de N, y se comienza a trabajar desde la ecuación (5.36) en el paso 6, hasta que  $k_{LA}$  de escala próxima sea igual a la obtenida en laboratorio.

14.1b Si Q se calcula del inciso a) entonces:

Se propone un valor de Q y se procede de la misma forma que en el método 2.

⇒ Método 2, usando:

Velocidad lineal del impulsor constante.

Calcular N directamente de la ecuación de la velocidad lineal. Para obtener el valor de Q, se proponen valores de este en la ecuación (5.42), hasta que la igualdad (5.48) se cumpla.

15. Calcular el consumo de potencia por agitación, desde el paso 6 al 9, con los valores de N y Q calculados.
16. Calcular la potencia por compresión.
- a) Calcular la presión absoluta de descarga ( $p_2$ )

$$P_{hidrostática} = \frac{4\rho Vg}{\pi D_T^2}$$

$$p_2 = P_{hidrostática} + 1 \text{ lb/pulg}^2$$

b) El valor de  $k$  para el aire varía de 1.39 – 1.41, y la  $p_1$  es la presión absoluta de succión.

c) Para cualquier compresor la potencia requerida en unidades del SI es:

$$kW_{ad} = 2.18 \times 10^{-4} \frac{k}{k-1} Q p_1 \left[ \left( \frac{p_2}{p_1} \right)^{(k-1)/k} - 1 \right] \quad (5.50)$$

### 5.7.2.2 Algoritmo de programación.

La figura 5.10 muestra el algoritmo de programación a través del cual se realizaron los cálculos de escalamiento considerando el criterio de similitud geométrica e introduciendo datos encontrados en bibliografía así como los recomendados por Chemineer Inc. [15,29,30] para relaciones geométricas bibliográficas y recomendadas por fabricantes, con la finalidad de establecer una comparación entre las dos. El algoritmo de programación fue adaptado al lenguaje de programación Visual Basic versión 5.0

5.7.2.3 Resultados de cálculo del cambio de escala usando el programa "Scale up".

Tabla 5.9 Propiedades del medio de cultivo\*

Densidad ( $\rho$ )	1000 kg/m <sup>3</sup>
Índice de consistencia (K)	5.0 kg/ms
Índice de comportamiento (n)	0.7
Difusividad del oxígeno en el medio ( $D_{O_2}$ )	$1.9 \times 10^{-9}$ m <sup>2</sup> /s
Tensión superficial ( $\sigma$ )	0.07 N/m
Tiempo de relajamiento ( $\lambda$ )	100 s
Viscosidad aparente ( $\mu_{app}$ )	1.28 kg/ms

Hubard 1994

**Tabla 5.10 Dimensiones de las diferentes escalas fermentativas de nivel piloto.**

Dimensiones (m)\Escala (m <sup>3</sup> )	0.002	0.1	0.3	0.5	0.7	1
<b>Bibliográfico</b>						
<b>Diámetro interior del tanque</b>	0.115	0.424	0.611	0.725	0.811	0.914
<b>Altura del líquido</b>	0.115	0.424	0.611	0.725	0.811	0.914
<b>Diámetro del impulsor</b>	0.034	0.127	0.183	0.217	0.243	0.274
<b>Altura d<sup>i</sup> impulsor sobre la base</b>	0.034	0.127	0.183	0.217	0.243	0.274
<b>Ancho de los baffles</b>	0.0115	0.0424	0.0611	0.0725	0.0811	0.0914
<b>Ancho de las hojas del impulsor</b>	0.0068	0.0254	0.036	0.0435	0.0487	0.0548
<b>Recomendado</b>						
<b>Diámetro del tanque</b>		0.348	0.503	0.596	0.667	0.751
<b>Altura del líquido</b>		0.627	0.905	1.073	1.2	1.352
<b>Diámetro del impulsor</b>		0.104	0.15	0.178	0.2	0.225
<b>Altura d<sup>i</sup> impulsor sobre la base</b>		0.0581	0.0838	0.0994	0.111	0.125
<b>Ancho de los baffles</b>		0.0348	0.0503	0.0596	0.0667	0.0751
<b>Ancho de las hojas del impulsor</b>		0.0209	0.0301	0.0357	0.04	0.045

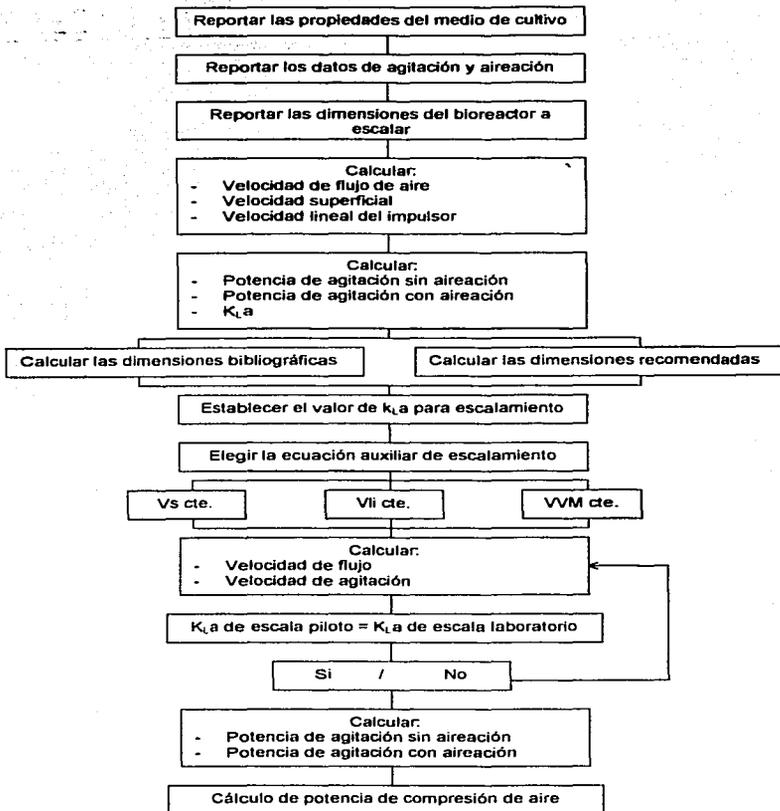


Fig. 5.10 Algoritmo de escalamiento. [2]

Las relaciones geométricas recomendadas las cuales fueron base para el cálculo para las dimensiones calculadas en la tabla 5.9 son:

**Tabla 5.11 Número de impulsores para la dispersión de gas.**

Numero de impulsores	Distribución de los impulsores		Relación máxima
	Fondo	Superficie	
1	$D_T/6$	-	1
2	$D_T/6$	$2H/3$	1.8

Chemineer Co. [17]

**Tabla 5.12 Valores de escalamiento correspondientes a la escala de fermentación de 0.002 m<sup>3</sup>**

Volumen de trabajo (m <sup>3</sup> )	0.0012
Flujo volumétrico (m <sup>3</sup> /s)	$1.99 \times 10^{-5}$
Número de aireación (Na)	0.067
Velocidad superficial (m/s)	$1.91 \times 10^{-3}$
Velocidad superficial del impulsor (m/s)	0.89
Número de Reynolds (Re)	7.47
* Número de la potencia (Np)	14.25
**PASA (HP)	$8.48 \times 10^{-4}$
***PACA (HP)	$2.89 \times 10^{-5}$
$k_{La}$	$5.49 \times 10^{-5}$

\* El Np se obtuvo de la figura 5.7.

\*\* Potencia de agitación sin aireación (P)

\*\*\* Potencia de agitación con aireación (P<sub>g</sub>)

Tabla 5.13 Condiciones de operación para las relaciones bibliográficas y recomendadas.

Propiedad/Escala (m <sup>3</sup> )	0.1	0.3	0.5	0.7	1
<b>RPM bibliográficos</b>					
Vs constante	172	128	111.56	102.3	92.94
VVM constante	141.9	100.02	85.08	76.44	68.22
Vli constante	133.2	92.4	78.06	69.78	61.98
<b>RPM recomendados</b>					
Vs constante	201.9	150.36	131.04	119.76	108.89
VVM constante	156.6	110.46	93.9	84.42	75.36
Vli constante	162	112.2	94.98	84.9	75.36
<b>Q (m<sup>3</sup>/s) bibliográfico</b>					
Vs constante	0.000271	0.000563	0.000792	0.000991	0.00125
VVM constante	0.000999	0.00299	0.00499	0.00699	0.00999
Vli constante	0.0015	0.00504	0.0088	0.0128	0.0191
<b>Q (m<sup>3</sup>/s) recomendado</b>					
Vs constante	0.000183	0.00038	0.000535	0.00067	0.00085
VVM constante	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01
Vli constante	0.0007	0.00263	0.00463	0.00672	0.00997
<b>PASA (HP) bibliográfico</b>					
Vs constante	0.00718	0.0157	0.0258	0.0356	0.0486
VVM constante	0.00463	0.00758	0.0107	0.014	0.0187
Vli constante	0.00371	0.00669	0.00829	0.0104	0.0136

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5.13 Continuación.**

<b>PASA (HP)</b>					
recomendado					
<b>Vs constante</b>	0.0065	0.0136	0.0195	0.027	0.0381
<b>VVM constante</b>	0.00325	0.00627	0.00926	0.00987	0.0123
<b>Vli constante</b>	0.00367	0.00627	0.00852	0.01	0.0123
<b>PACA (HP)</b>					
bibliográfico					
<b>Vs constante</b>	0.000254	0.00057	0.00095	0.00132	0.00181
<b>VVM constante</b>	0.000258	0.000508	0.000749	0.00103	0.00144
<b>Vli constante</b>	0.000238	0.00052	0.000706	0.00094	0.00131
<b>PACA (HP)</b>					
recomendado					
<b>Vs constante</b>	0.000214	0.000458	0.000665	0.000936	0.00131
<b>VVM constante</b>	0.000191	0.000431	0.000683	0.00076	0.000999
<b>Vli constante</b>	0.000193	0.000413	0.000612	0.000763	0.000998
<b>*PCA (HP) bibliográfico</b>					
<b>Vs constante</b>	0.00000041	0.0000012	0.0000020	0.0000028	0.0000040
<b>VVM constante</b>	0.0000015	0.0000065	0.0000129	0.0000202	0.0000324
<b>Vli constante</b>	0.00000229	0.0000110	0.000023	0.000037	0.0000619
<b>*PCA (HP)</b>					
recomendado					
<b>Vs constante</b>	0.00000041	0.0000012	0.0000020	0.0000028	0.0000040
<b>VVM constante</b>	0.00000225	0.0000096	0.0000189	0.0000295	0.0000473
<b>Vli constante</b>	0.00000158	0.0000084	0.0000175	0.0000283	0.0000472

\* PCA = potencia compresión de aire (kW<sub>ad</sub>)

Tabla 5.14 Número de aereación

Bibliograficos	0.1	0.3	0.5	0.7	1
N vs constante	172	128	111.56	102.3	92.94
Q vs constante	0.000271	0.000563	0.000792	0.000991	0.00125
Di	0.127	0.183	0.217	0.243	0.274
Na	0.04615098	0.04306222	0.04168586	0.04050703	0.03922897
N vvm constante	141.9	100.02	85.08	76.44	68.22
Q vvm constante	0.000999	0.00299	0.00499	0.00699	0.00999
Di	0.127	0.183	0.217	0.243	0.274
Na	0.20621639	0.29267277	0.3443857	0.3823745	0.42712337
N vli constante	133.2	92.4	78.06	69.78	61.98
Q vli constante	0.0015	0.00504	0.0088	0.0128	0.0191
Di	0.127	0.183	0.217	0.243	0.274
Na	0.32985807	0.5340188	0.66195151	0.76702838	0.89883786
Recomendados	0.1	0.3	0.5	0.7	1
N vs constante	201.9	150.36	131.04	119.76	108.89
Q vs constante	0.000183	0.00038	0.000535	0.00067	0.00085
Di	0.104	0.15	0.178	0.2	0.225
Na	0.04834660	0.04492921	0.04343513	0.04195892	0.04111825
N vvm constante	156.6	110.46	93.9	84.42	75.36
Q vvm constante	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01
Di	0.104	0.15	0.178	0.2	0.225
Na	0.34061163	0.48282938	0.56649444	0.62189055	0.69897687

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5.14 Continuación**

<b>N vii constante</b>	<b>162</b>	<b>112.2</b>	<b>94.98</b>	<b>84.9</b>	<b>75.36</b>
<b>Q vii Constante</b>	<b>0.0007</b>	<b>0.00263</b>	<b>0.00463</b>	<b>0.00672</b>	<b>0.00997</b>
<b>Di</b>	<b>0.104</b>	<b>0.15</b>	<b>0.178</b>	<b>0.2</b>	<b>0.225</b>
<b>Na</b>	<b>0.23048053</b>	<b>0.41671618</b>	<b>0.51860902</b>	<b>0.59363958</b>	<b>0.69687994</b>

Fig. 5.11

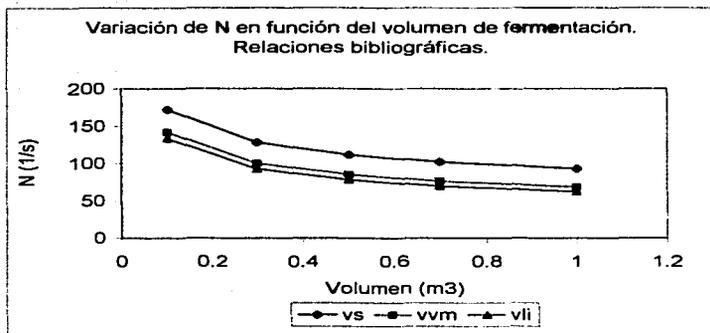
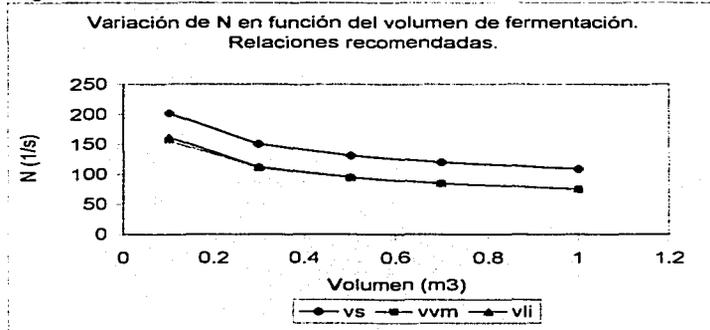


Fig. 5.12



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.13

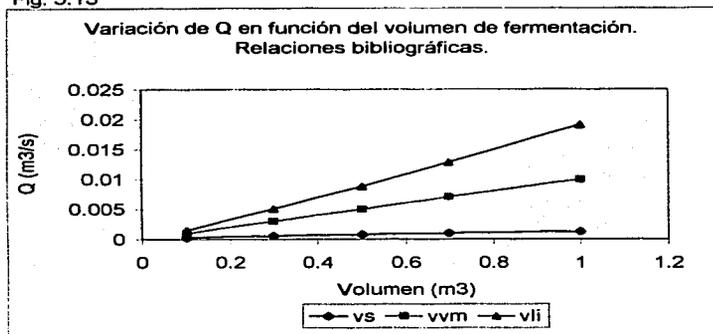


Fig. 5.14

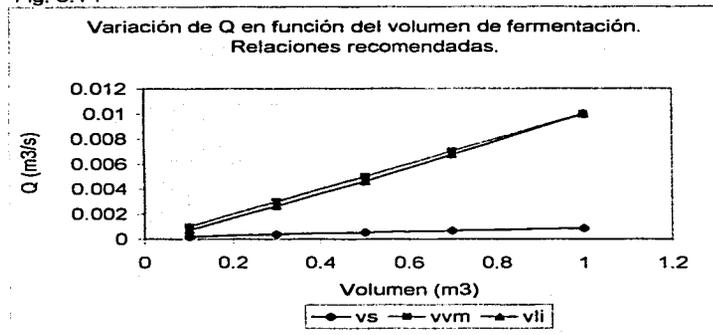


Fig. 5.15

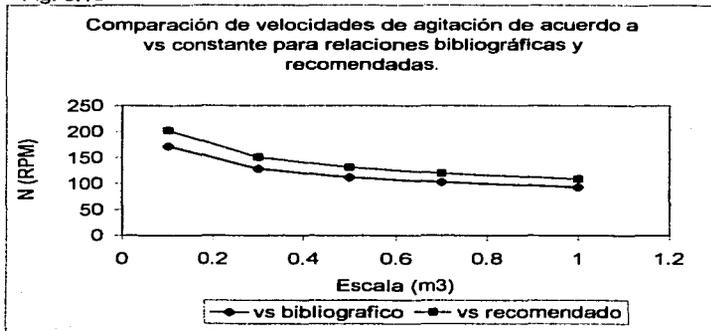
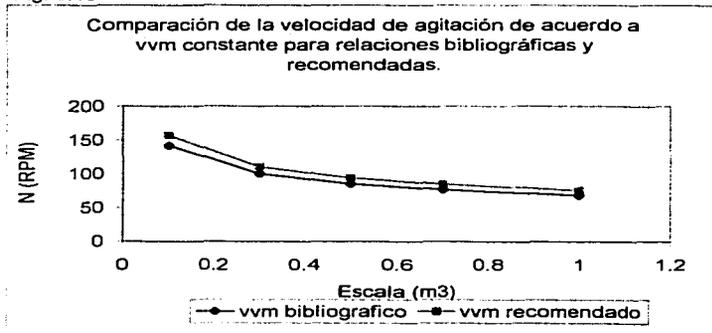


Fig. 5.16



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.17

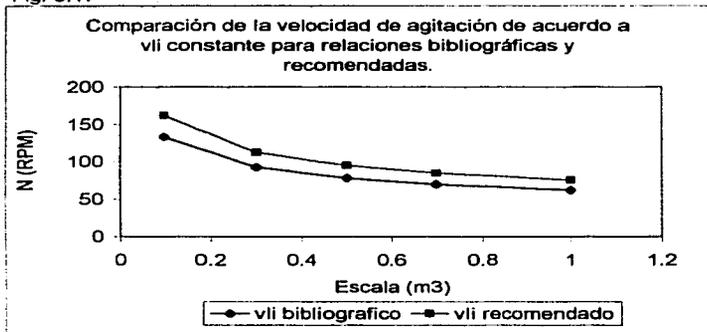


Fig. 5.18

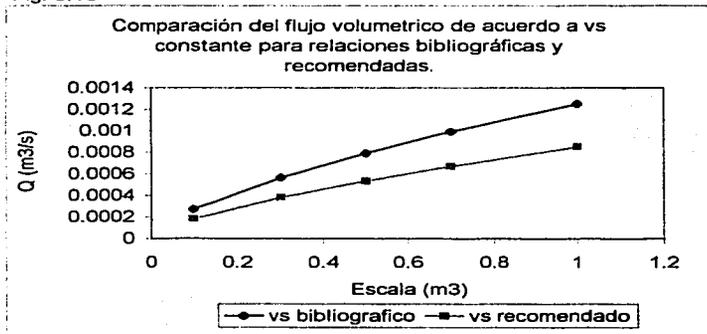


Fig. 5.19

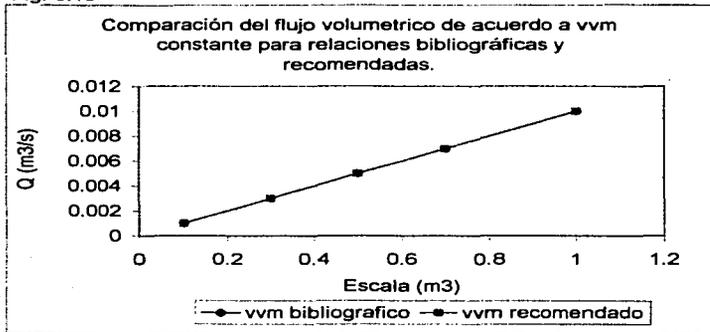
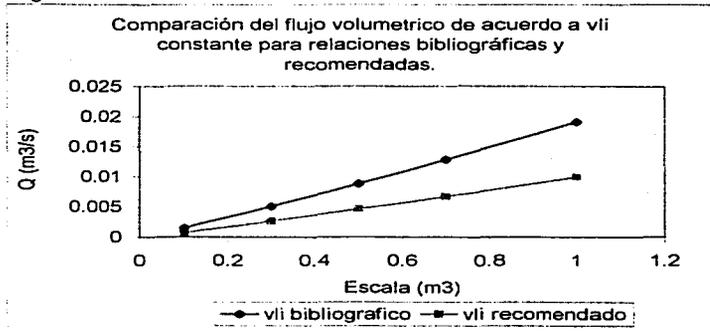


Fig. 5.20



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.21

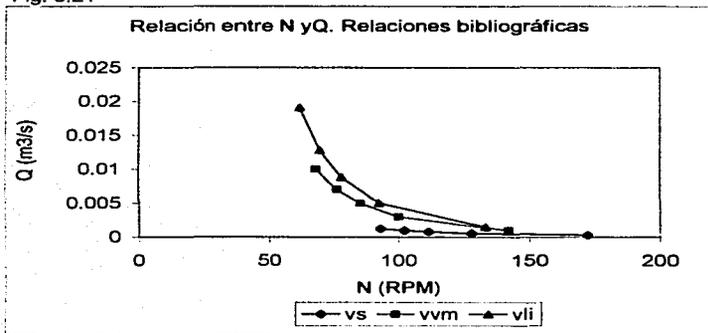


Fig. 5.22

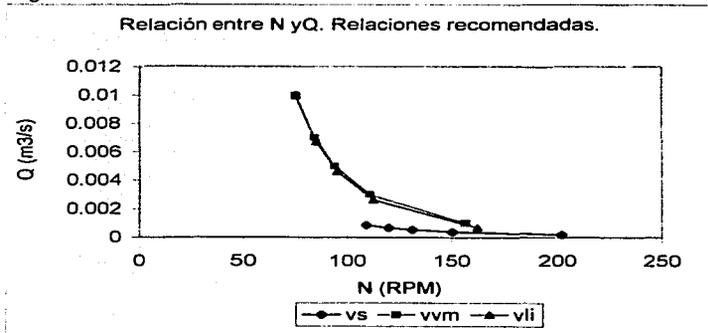


Fig. 5.23

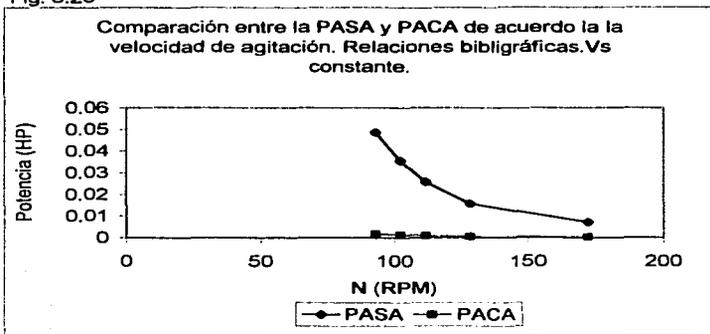
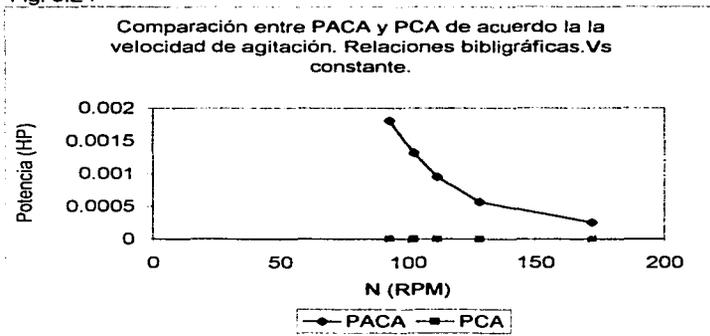


Fig. 5.24



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.25

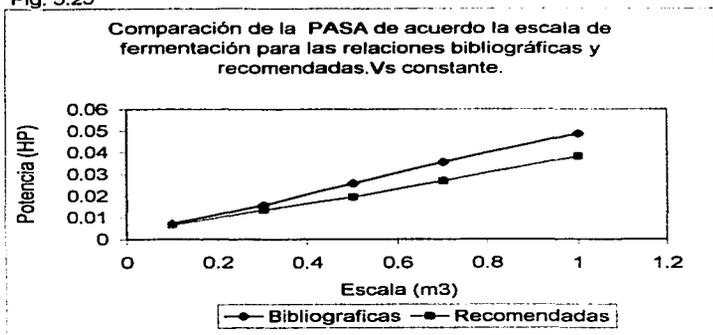


Fig. 5.26

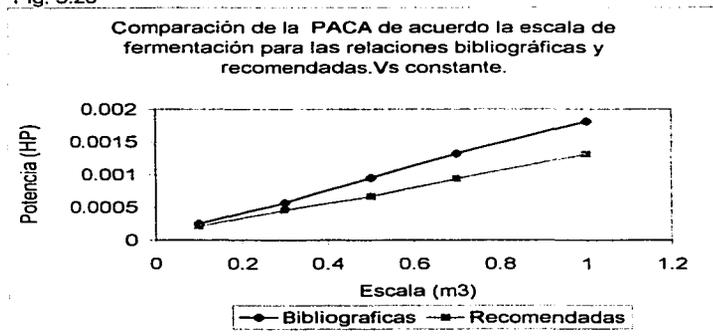


Fig. 5.27

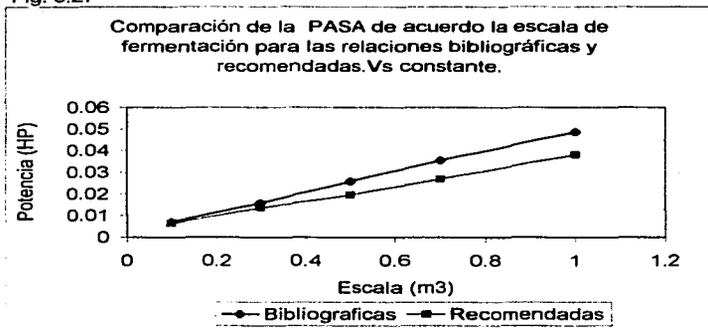
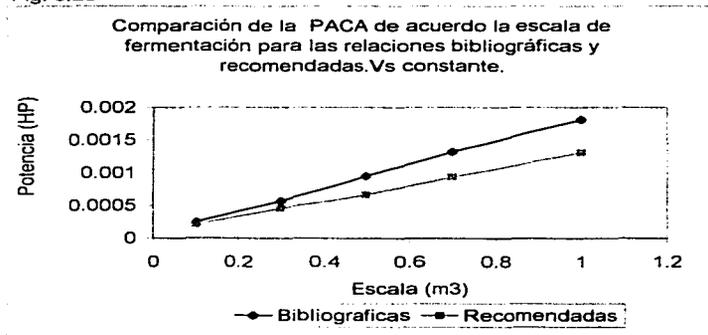


Fig. 5.28



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.29

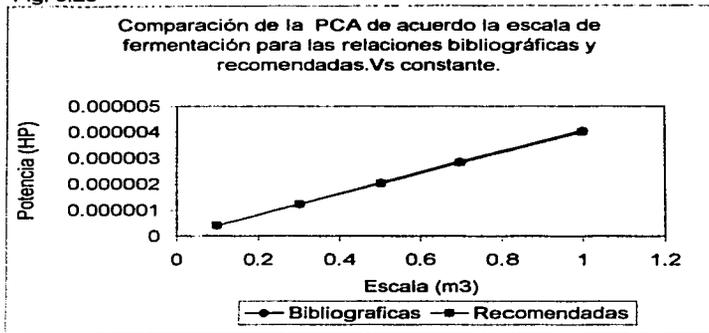


Fig. 5.30

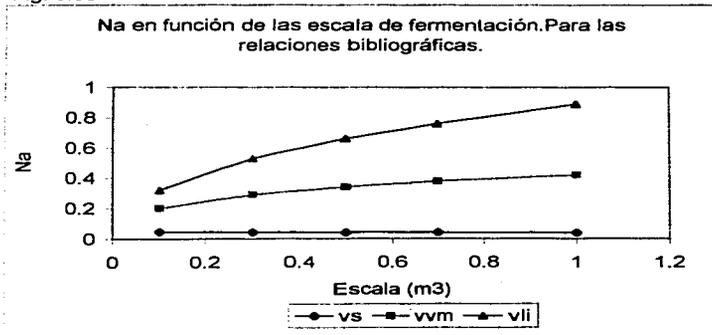


Fig. 5.31

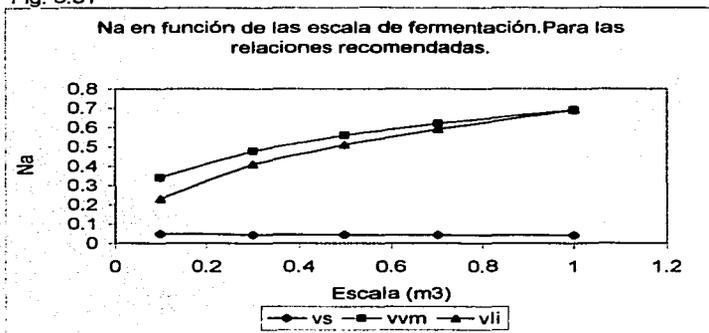
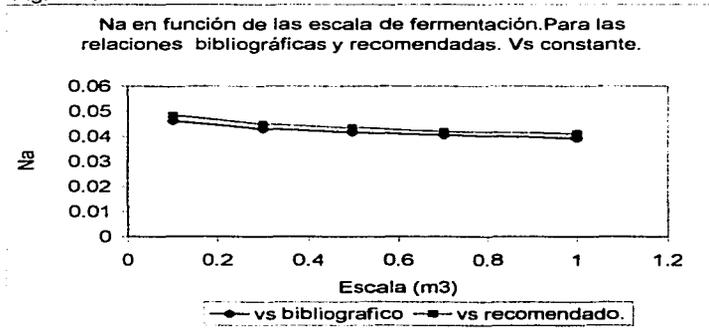


Fig. 5.32



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **CAPITULO III: DISEÑO DEL BIOREACTOR**

### **6. DISEÑO DEL BIOREACTOR (PRESENTACIÓN DEL MISMO DE FORMA INTEGRADA EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE $\alpha$ AMILASA)**

#### **6.1 Presentación y descripción del diagrama de flujo.**

La figura 6.1 presenta el diagrama de flujo para la producción de  $\alpha$  amilasa, desde la preparación del medio de cultivo hasta su aislamiento y purificación [25].

En el diagrama de flujo se presenta el uso de cada servicio auxiliar y su punto de aplicación dentro del proceso de producción de  $\alpha$  amilasa. Cada uno de estos servicios debe de cumplir con determinadas características, adecuadas a la función que desempeñen dentro del proceso de producción de  $\alpha$  amilasa (apartado 9, apéndice 6)

##### *6.1.1 Preparación del medio de cultivo.*

Los compuestos crudos como la harina de soya y el resto de los materiales sólidos secos, son hidratados por separado en tanques agitados de tamaño apropiado.

Una vez que los materiales sólidos se encuentran en suspensión, estos son bombeados a un tanque agitado, donde se mezclan, formando así el medio de cultivo. Después de que el medio de cultivo adquiere las concentraciones recomendadas de nutrientes y ajustado al pH apropiado, este es bombeado al reactor principal, donde es esterilizado.

### *6.1.2 Preparación del inóculo de fermentación.*

El inóculo a ser usado en el reactor principal, es preparado en un bioreactor alternativo de inoculación. El tamaño de este, estará en función del volumen de trabajo del reactor principal. La concentración recomendada de inóculo para bacterias se encuentra en el intervalo del 0.1-0.3%. De este porcentaje, se define el tamaño del bioreactor de inoculación.

Es importante mencionar que el transporte del inóculo del bioreactor de inoculación al bioreactor principal, se realiza en condiciones estériles. Para asegurar estas condiciones de esterilidad, es necesario que ambos recipientes se mantengan a una presión positiva, con la inyección de aire estéril.

Las tuberías que conectan a los dos bioreactores son esterilizadas con vapor y posteriormente se procede al transporte del inóculo mediante aire estéril comprimido. La construcción del bioreactor de inoculación estará construido de los mismos materiales y sujeto a las mismas normas de construcción que el reactor principal.

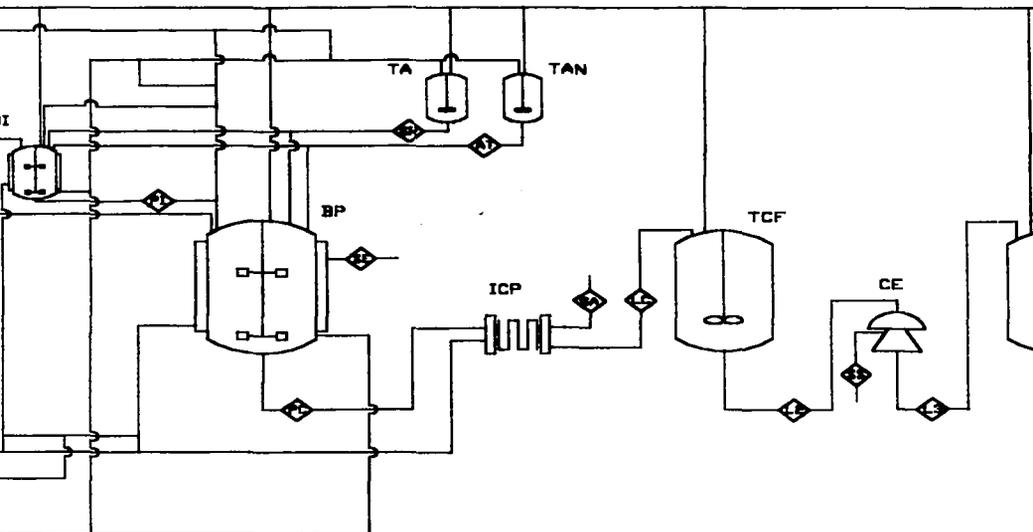
### *6.1.3 Adición de antiespumante y solución amortiguadora.*

Tanto el antiespumante como la solución reguladora de pH (carbonato de calcio), son impulsados desde el recipiente que los contiene hasta el bioreactor principal, por aire comprimido. El aire debe de ser estéril, por lo cual debe ser tratado con una serie de filtros.

### *6.1.4 Esterilización del medio de cultivo.*

La esterilización del medio de cultivo se realizara in situ con vapor saturado como medio de calentamiento que circule por el interior de la camisa de calentamiento. Como se verá en el capítulo II, apartado 10, en un cultivo batch, la temperatura de esterilización es de 121°C a una presión de 37 psig. El enfriamiento del medio de

# ma de flujo para la producción de alfa amilasa en dilucló



Simbología		
	Lineas	
	SE	Salida de vapor condensado o agua de enfriamiento
	PC	Caldo fermentando
ación	SA	Salida de agua de enfriamiento
	LC	Caldo fermentado frío
	L2	Caldo fermentado floculado
	SS	Biomasa y sólidos agregados
	L3	Caldo fermentado libre de sólidos
	L4	Solución enzimática de composición variable
	L5	Línea de estandarización y concentración
	L6	Solución enzimática concentrada.

TM1, TM2, TM3	Tanque
TM4	Tanque
TA	Deposito
TAN	Deposito
BI	Bioreact
BP	Bioreact
ICP	Intercam
TCF	Tanque
CE	Centrifug
TA1, TA2	Tanque
UFEM	Untrafiltr
FP	Filtro pr
FC	Filtro de

cultivo hasta la temperatura de fermentación, es logrado por medio de agua de enfriamiento recirculada y enfriada en una torre de enfriamiento.

#### *6.1.5 Fermentación*

Las condiciones adecuadas de fermentación para la producción de  $\alpha$  amilasa a partir de *Bacillus Licheniformis*, ya han sido mencionadas el capítulo I, apartado 3. El tiempo total de fermentación es de alrededor de 120 horas, lo cual representa 5 días de operación del bioreactor, solo en esta etapa.

#### *6.1.6 Enfriamiento del medio de cultivo, durante la fermentación.*

La elevación en la temperatura del medio de cultivo por el calor generado atribuido a la actividad metabólica del microorganismo es controlada por la circulación de agua de enfriamiento por la camisa del bioreactor. El dispositivo de enfriamiento al igual que en esterilización, consiste de agua recirculada que es enfriada en una torre de enfriamiento.

#### *6.1.7 Enfriamiento del caldo fermentado.*

Al efectuar la cosecha del caldo fermentado, este es inmediatamente enfriado a una temperatura cercana a los 5°C. La principal razón por la cual se enfría el caldo fermentado es la de facilitar la floculación de las partículas sólidas.

#### *6.1.8 Floculación del caldo fermentado.*

Una vez que el caldo se enfría, a floculación de los sólidos y la biomasa en el caldo fermentado es realizado por sales que facilitan su agregación.

### **6.1.9 Centrifugación (separación sólido – líquido).**

La biomasa y sólidos floculados son separados del caldo fermentado con la ayuda de centrifugas de discos de forma continua.

### **6.1.10 Ultrafiltración (concentración).**

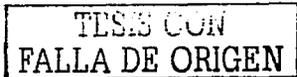
El caldo fermentado es concentrado a través de ultrafiltración de etapa múltiple, obteniendo así una solución con una concentración de enzima del 2%.

### **6.2 Revisión del código de construcción ASME y selección de materiales de construcción.**

Muchos de los bioreactores son diseñados para trabajar en operaciones de esterilización (capítulo 3, apartado 9). En general los bioreactores son construidos como recipientes a presión, para esterilización in situ, a temperaturas alrededor de los 130 °C y presiones de 37 psig (225 kPa o 2.5 Bar) [39]. El vapor de calentamiento que circula por la camisa del bioreactor debe ser por lo mínimo 2 Bar más grande que la presión la cual el medio de cultivo se esterilice [2]

Las bases técnicas de construcción de recipientes a presión, están definidas por las guías nacionales, válidas donde el recipiente vaya a ser usado.

El código ASME (American Society of Mechanical Engineers), en su sección VIII – División 1 (ASME Boiler and Pressure Vessel Code) [3], establece el camino por el cual el recipiente puede ser diseñado y fabricado. El código ASME establece que un recipiente puede ser considerado como recipiente a presión, si este opera alrededor de los 15psig y su diámetro es mayor a los 15 cm.



### 6.2.1 Clasificación de los aceros inoxidables.

La tabla 6.1 y 6.2 muestra los tipos de aceros inoxidables, con sus respectivas composiciones químicas y propiedades físicas. Para mayores datos de propiedades necesarias para dieño, consulte la tabla A7.1 del apéndice 7.

La tabla 6.1 se denota cuales son los tipos de aceros más apropiados para la construcción del cuerpo del bioreactor: aceros V4A y V2A.

En general los recipientes usados en procesos biológicos, son fabricados a partir de aceros 316 o 316L [39].

Referente al acabado interior de los aceros 316 o 316L, se requieren pulidos que ofrezcan rugosidades que impidan en la mayor medida posibles depósitos de microorganismos o componentes del medio de cultivo que fomenten la contaminación de fermentaciones posteriores. El pulido superficial, se realiza por medio de sustancias abrasivas, las cuales deben tener como mínimo 0.6  $\mu\text{m}$  (220 grit) para ser aceptado y aprobado en un proceso biotecnológico [39].

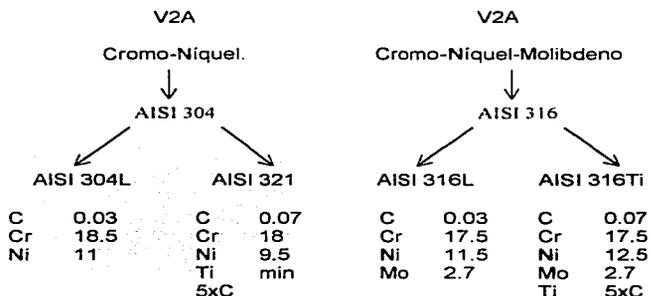


Tabla 6.1 Aceros inoxidables para recipientes biotecnológicos.

Tabla 6.2 Tipos de aceros inoxidable. [39]

Tipo de acero	Composición%					Propiedades	Usos
	Cr	C	Ni	Mn	Mo		
Cromo	14.25	0.05 -0.2				Resistente al calor, baja resistencia a la corrosión.	Utensilios caseros, turbinas.
Cromo -Niquel	26	0.8	4.5			Resistente al calor, fácil del moldear.	Industrias de moldeado, válvulas, bombas.
Cromo -Niquel -Manganeso	18	0.05 -0.09	4.5	8		De fácil moldeado, resistente al calor.	Utensilios caseros, industrias de alimentos, bebidas, construcción y ácido nítrico.
Cromo -Niquel V2A	12.5 -18	0.03 0.1	8.5 12.5			Alta resistencia a la corrosión y calor, fácil de soldar.	Utensilios caseros, industrias de: alimentos, construcción, químicas y maquinaria de pequeña escala.
Cromo -Niquel -Molibdeno V4A	16.5 -20	0.03 -0.08	9-30		1.5 -6	Alta resistencia a la corrosión y calor, fácil de soldar.	Industria químicas, de de escaldado y de sulfito. alimentos,
Cromo -Niquel	17 -25	0.08 -0.4	9 -36			Altamente resistente al calor.	Industrias caloríficas y de moldeado.
Cromo	5-17	0.08 -0.3				Alta resistencia al calor, rigidez mecánica, difícil de soldar.	Utensilios caseros, turbinas, impulsores.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**6.2.2 Cálculo del espesor de las paredes (casco) y cabeza del bioreactor por presión interna.**

ASME en su sección VIII división 1. UG-27 espesor de cascos bajo presión interna. [3]

**1. Determinar la presión de operación.**

Es la presión que se requiere en el proceso del que forma parte el recipiente, a la cual trabaja normalmente este.

**2. Calcular la presión de diseño (UG-21).**

Es la presión que se emplea para diseñar el recipiente. Se recomienda diseñar un recipiente y sus componentes para una presión mayor que la de operación. Este requisito se satisface con una presión de diseño de 30 lb/in<sup>2</sup> (206.85 kPa) o 10% mas de la presión de trabajo o la que sea mayor. También debe tomarse en consideración la presión del fluido y de cualquier otra sustancia contenida en el recipiente.

**3. Valores del esfuerzo máximo permitido (UG-23)**

Los valores del esfuerzo de tensión máximo permitido para diferentes materiales se presenta en la tabla A7.2 del apéndice 7.

**4. Eficiencia de las juntas.**

La eficiencia de los diferentes tipos de juntas soldadas aparece en la tabla A7.3 del apéndice 7.

### PRESIÓN INTERNA [41]

Ecuaciones expresadas en función de las dimensiones interiores.

P = Presión de diseño o presión máxima de trabajo permitida, lb/pulg<sup>2</sup>

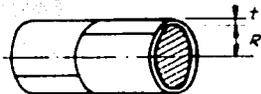
S = Valor del esfuerzo del material, lb/pulg<sup>2</sup>

E = Eficiencia de la junta

R = Radio interior, pulgadas

D = Diámetro interior, pulgadas

t = espesor de la pared, pulgadas.

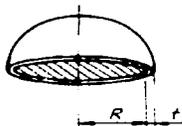


Casco cilíndrico (costura longit.)<sup>1</sup>

$$t = \frac{PR}{SE - 0.6P}$$

$$P = \frac{SEt}{R + 0.6t}$$

1. Generalmente rige el esfuerzo en la costura longitudinal.

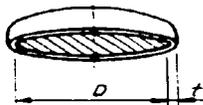


Esfera y cabeza hemisférico

$$t = \frac{PR}{2SE - 0.2P}$$

$$P = \frac{2SEt}{R + 0.2t}$$

1. Para las cabezas sin brida resta, úsese la eficiencia de junta de la cabeza al casco si es menor que la eficiencia de las costuras de la cabeza.



Esfera elipsoidal 2:1

$$t = \frac{PD}{2SE - 0.2P}$$

$$P = \frac{2SEt}{D + 0.2t}$$

WELDON  
FALLA DE ORIGEN

## PRESIÓN INTERNA [41]

Ecuaciones expresadas en función de las dimensiones interiores.

P = Presión de diseño o presión máxima de trabajo permitida, lb/pulg<sup>2</sup>

S = Valor del esfuerzo del material, lb/pulg<sup>2</sup>

E = Eficiencia de la junta

R = Radio interior, pulgadas

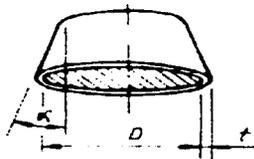
D = Diámetro interior, pulgadas

$\alpha$  = la mitad del ángulo en el vértice, grados

L = radio interior del casquete, pulgadas

r = radio interior de las curvaturas, pulgadas

t = espesor de pared, pulgadas

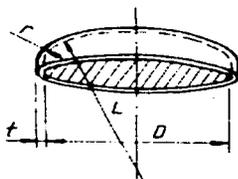


Cono y sección cónica.

$$t = \frac{PD}{2 \cos \alpha (SE - 0.6P)}$$

$$P = \frac{2SEt \cos \alpha}{D + 1.2t \cos \alpha}$$

1. La mitad del ángulo en el vértice,  $\alpha$  no mayor de 30°



Cabeza ASME bridada y alabeada  
(cabeza torisférica)

Cuando  $L/r = 16 \text{ 2/3}$

$$t = \frac{0.885PL}{SE - 0.1P}$$

$$P = \frac{SEt}{0.885L + 0.1t}$$

Cuando  $L/r$  es menor a  $16 \text{ 2/3}$

$$t = \frac{PLM}{2SE - 0.2P}$$

$$P = \frac{2SEt}{LM + 0.2t}$$

Valores del factor "M"																	
L/r	1	1.2	1.5	1.7	2	2.2	2.5	2.7	3	3.2	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5
M	1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3
L/r	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12	13	14	15	16	16	*
M	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.7	1.7	1.7	

\* La máxima razón permitida es:  $L = D + 2t$

### 6.2.3 Resultados del cálculo del espesores de las paredes y cabezas del bioreactor de acuerdo a las recomendaciones del código ASME.

El cálculo del espesor de las paredes y cabezas del bioreactor se calcularon de acuerdo a la presión de esterilización del medio de cultivo por inyección directa de vapor, según lo establece Lyndersen.

Tabla 6.3 Presiones de esterilización.

Referencia	Temperatura (°C)	Presión (psig)
Lyndersen (1994)	130	37
Brennan (1980)*	115-127	50.75-60.17
Planta piloto UNAM*	-	63.99

\* Datos de esterilización.

Tabla 6.4 Presiones de vapor de calentamiento.

Referencia	Presión de vapor de caldera (psig)	Presión de vapor en la camisa (psig)
Planta piloto UNAM	85.32	-

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Tabla 6.4 Continuación**

Planta piloto Instituto de Biotecnología UNAM	85.32	28.44
---	-------	-------

Nota: la presión de vapor saturado correspondiente a 121 °C es de 15.75 psig.

**Tabla 6.5 Dimensiones externas del bioreactor.**

Dimensiones	Calculado	Comercial
Volumen de trabajo (m <sup>3</sup> )	0.6	
Diámetro interior del bioreactor (m)	0.751	
Altura del líquido (m)	1.352	
Presión por el medio de cultivo (psig)	1.91	
Presión de operación (psig)	37	
Presión de diseño (psig)	42.8	
Esfuerzo del material a 130 °C (psig)	11900	
Eficiencia de la junta	0.6	
Margen de corrosión (m)	0.0031	
Espesor del casco cilíndrico	5.43	7.9
Espesor de la cabeza ASME	7.16	7.9
Espesor de la camisa de calentamiento		7.9

#### **6.2.4 Accesorios del bioreactor.**

Los materiales de construcción que podrían usarse para la manufactura de los accesorios interiores del bioreactor, en especial de los impulsores, es el acero - cromo, por las propiedades de dureza mecánica.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

#### 6.2.4.1 Accesorios de agitación y aireación.

##### a) Impulsores

Mucho se ha tratado sobre los impulsores en el capítulo 8, y de la ventaja de usar discos de turbina de 6 hojas. Las relaciones geométricas adecuadas, también se presentan en el capítulo 8.

##### b) Deflectores o baffles.

En el capítulo 2, apartado 5 se presentan las relaciones geométricas recomendadas para determinar las dimensiones de los baffles. El bioreactor contará con cuatro baffles soldados a la pared del bioreactor de forma perpendicular, es decir a  $90^\circ$  de la pared.

##### c) Sellos.

1. *Sellos estáticos.* Es indispensable el acceso al caldo de cultivo para la supervisión y control del proceso. Los puertos de toma de muestras, mirillas, escotillas, puertos de adición y remoción, deben sellarse herméticamente con el fin de mantener condiciones estériles dentro del bioreactor. Sellos de anillo (O rings) son los elementos principales se sellado estático en Biotecnología, especialmente donde existen puertos pequeños. Los anillos O son circulares, y son fabricados a partir de diferentes materiales como viton, etilenpropileno (EP) y silicon. EP es el más usado y recomendado en Biotecnología y tecnología de alimentos. Los sellos EP soportan temperaturas de  $-40$  a  $160$  °C y son resistentes al vapor de agua.
2. *Sellos del espacio de rotación.* El espacio de rotación, es una posible fuente de contaminación, si no se controla de forma adecuada. Los sellos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mecánico son usados con frecuencia en bioreactores de escala industrial. El sello se compone de dos partes, una estacionaria y otra móvil que rota sobre el eje; los dos componentes son contraidos por resortes o fuelles. Para lubricar y enfriar el sello durante la operación, es usado condensado de vapor de agua.

d) Puertos de entradas y salidas.

Los puertos son necesarios para la instalación de toma de sistemas de toma de muestras y entrada y salida de materiales de proceso y de productos respectivamente. Por conveniencia de construcción, el tamaño de los puertos se encuentran estandarizados de la siguiente forma [39]:

25 mm para toma de pruebas y válvulas dosificadoras.

34 mm para algunos puertos dosificadores.

El puerto del fondo del bioreactor debe ser diseñado de acuerdo a la capacidad de la válvula de vaciado, para obtener una rápida evacuación del medio de cultivo y un mejor lavado del bioreactor.

e) Mirillas de vidrio.

Las mirillas colocadas sobre el casco superior o sobre las paredes del bioreactor, son usadas para la observación del medio de cultivo cuando el cuerpo del bioreactor es de acero. Para minimizar los espacios muertos y los problemas de limpieza, la colocación de las mirillas debe ser al parejo con las paredes interiores del bioreactor y estar redondeadas, para facilitar la limpieza.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

f) Difusores.

El difusor es el sistema que tiene la función de introducir aire dentro del caldo de cultivo. Existen 3 tipos de difusores, los cuales son:

1. *Difusores de poro.* Son hechos de vidrio, de cerámicas o de metal y se usan principalmente en escala laboratorio, en recipientes no agitado. El tamaño de burbuja formado en estos difusores, varía de 10 a 100 veces más grande que el tamaño del poro del bloque aereador. La cantidad de aire usada es baja, a causa de la caída de presión a través del difusor. Existe también el problema de taponamiento de los poros por el crecimiento celular.
2. *Difusores de orificio.* Estos difusores están hechos de tubos perforados. En pequeños tanques agitados, los difusores son montados bajo el agitador en forma de anillo de aproximadamente  $\frac{3}{4}$  del diámetro del impulsor. El tamaño del impulsor puede tener como mínimo 6 mm de diámetro, con la finalidad de evitar bloqueos y de minimizar la caída de presión.
3. *Difusores de boquillas.* La mayoría de los bioreactores agitados, de escala laboratorio e industrial, usan difusores de boquillas, los cuales constan de tubos abiertos o parcialmente cerrados, para la formación de corrientes de burbujas. Idealmente el difusor debe estar debajo del impulsor, tanto lejos sea posible, para evitar que el impulsor se inunde de la corriente de aire. Los difusores de boquilla provocan una baja caída de presión que cualquier otro difusor y normalmente no presenta obstrucción de la abertura.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la figura 6.2, se muestran los accesorios, los puertos de conexión, la ubicación de las sondas de medición en el cuerpo del bioreactor y las principales dimensiones para el bioreactor de 1 m<sup>3</sup> de volumen total.

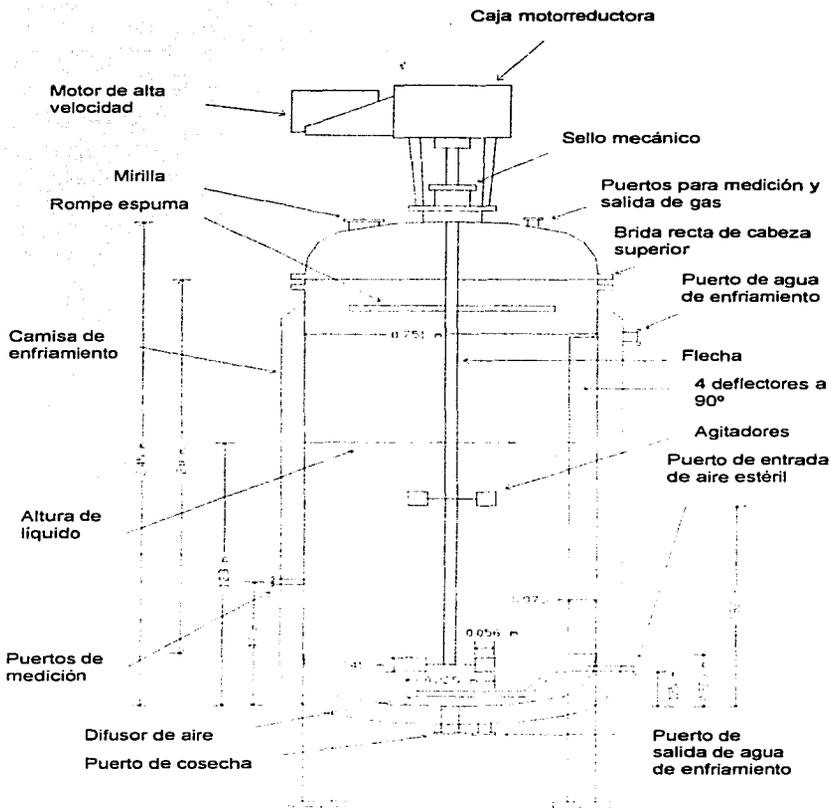
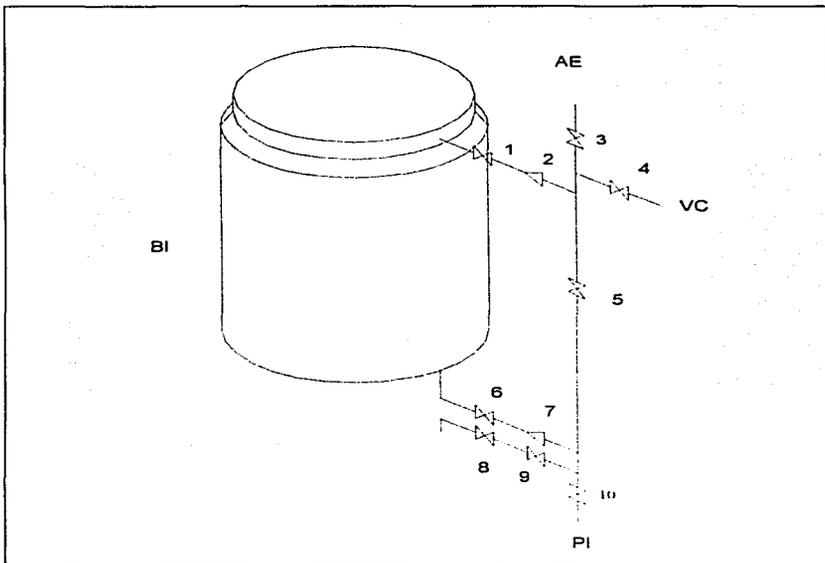


Fig. 6.2 Principales dimensiones y accesorios del bioreactor de 1 m<sup>3</sup> de volumen total.

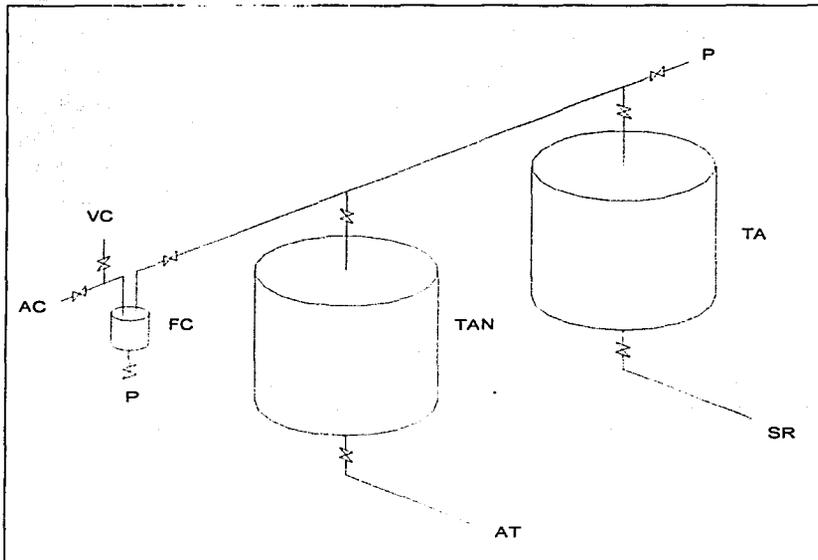
### 6.3 Arreglos de tuberías.

Fig. 6.3 Transporte del inoculo. [55]



Simbología	
BI	Bioreactor de inoculación.
AE	Entrada de aire estéril.
VC	Entrada de vapor de esterilización.
PI	Puerto de inoculación.
2,7	Válvulas antiretorno.
1,3,4,5,6,8,9,10	Válvulas de diafragma.

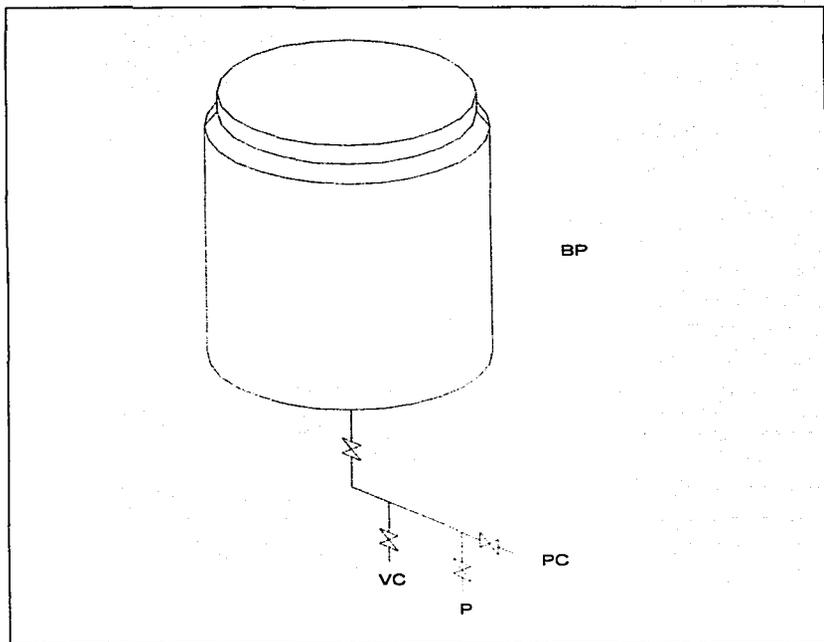
Fig. 6.4 Transporte de antiespumante y álcali. [21]



Simbología

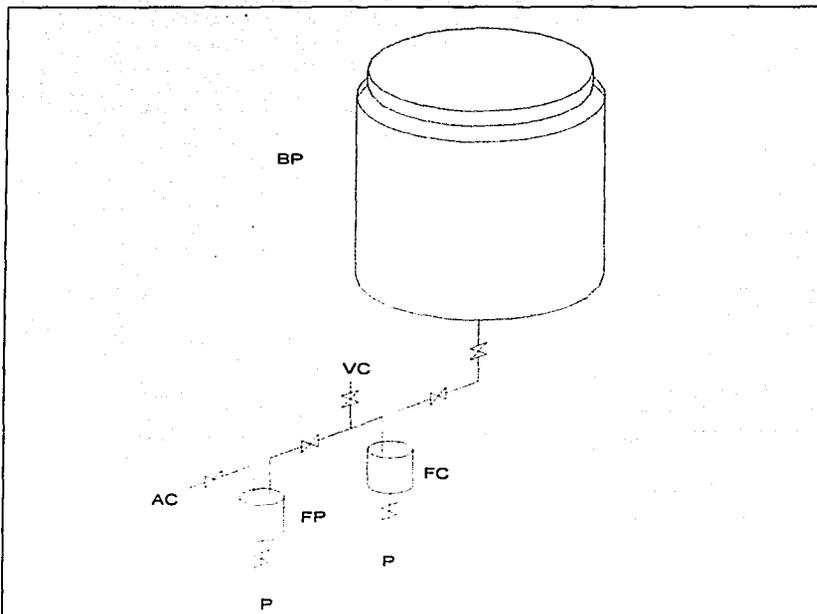
FC	Filtro de cartucho.
TA	Tanque de álcali.
TAN	Tanque de antiespumante
VC	Vapor de esterilización.
AC	Aire comprimido.
P	Purga.
AT	Puerto de inyección de antiespumante.
SR	Puerto de inyección de álcali.

Fig. 6.5 Puerto de cosecha. [21,55]



Simbología	
BP	Bioreactor de producción.
VC	Vapor de calentamiento y esterilización.
PC	Puerto de cosecha y toma de muestras.
P	Purga.

Fig. 6.6 Puerto de aire estéril de fermentación. [14,50,54]

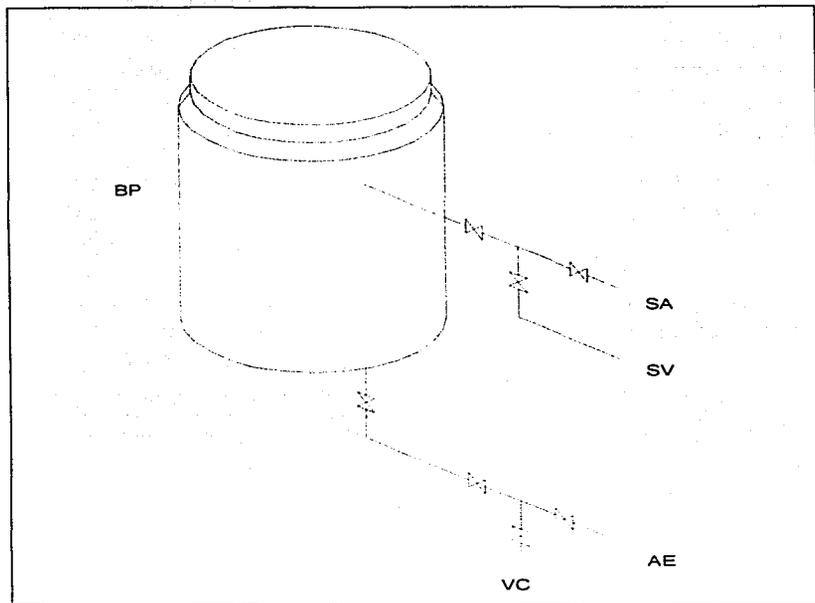


Simbología

BP	Bioreactor de producción.
VC	Vapor de calentamiento y esterilización.
AC	Aire comprimido.
FP	Filtro profundo.
FC	Filtro de cartucho.
P	Purga.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6.7 Circuito de calentamiento y refrigeración. [14]

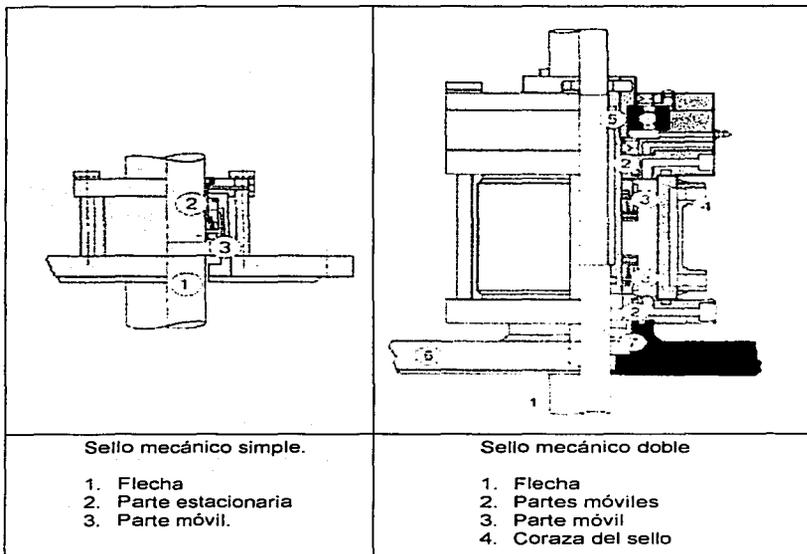


Simbología

BP	Bioreactor productivo.
VC	Entrada de vapor de calentamiento.
AE	Entrada de agua de enfriamiento, proveniente de la torre de enfriamiento.
SA	Salida del agua de enfriamiento.
SV	Salida del vapor condensado.

#### 6.4 Arreglos de los sellos mecánicos y sistemas de agitación.

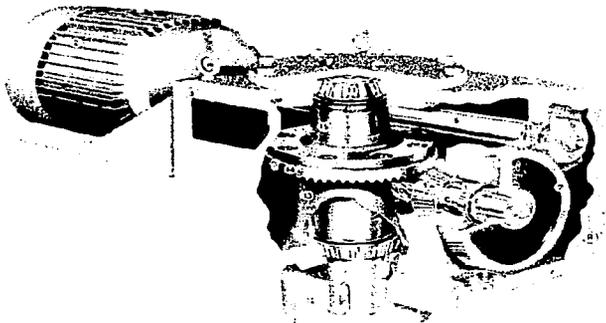
Fig. 6.8 Sellos mecánicos. [17,61]



Existe una variedad de sellos mecánicos que prosperen las condiciones de inocuidad del medio de cultivo. Los figuras anteriores suelen ser los mas utilizados en bioreactores.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6.9 Tipo de motoreducción. [16,17,61]



La selección del sistema de agitación depende de las características del sistema de fermentación, por lo cual el fabricante debe de proveer el sistema mas apropiado para el sistema en particular.

1. Soporte del motor.
2. Motor.
3. Coraza del sistema motorreductor.
4. Soportes.
5. Flecha de alta velocidad.
6. Piñón de cambio de velocidad.
7. Engrane de cambio.
8. Engrane de cambio.
9. Drenado de lubricante.
10. Piñón de espiral.
11. Piñón de espiral.
12. Flecha de baja velocidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.5 Arreglos de los sistemas de medición.

*Fig. 6.10 Ubicación de las sondas de medición.*

Puertos para  
sondas de  
medición.



La ubicación de las sondas de medición tal como se muestra en la figura 6.10 se denota a la altura media del nivel del líquido. Si no se tiene cuidado en la ubicación de las sondas, podrían tomarse datos que no concuerden con todo el resto del caldo de fermentación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7. ESTERILIZACIÓN.

A lo largo de un proceso de fermentación no se debe correr el riesgo de contaminarse por la presencia de un microorganismo extraño, que ocasione pérdidas en la producción de enzimas.

Para reducir el riesgo de contaminación, se deben de tomar en cuenta las siguientes condiciones:

- a) Esterilización del medio de cultivo.
- b) Esterilización del biorreactor.
- c) Esterilización de los materiales agregados durante la fermentación.
- d) Conservación de las condiciones asépticas durante la fermentación.

Un parámetro importante para reducir el riesgo de contaminación es el pH. La producción de  $\alpha$  amilasa a partir de *Bacillus Licheniformis* es favorecida a potenciales de hidrógeno cercanos al neutro, por lo cual si no se tiene un control adecuado sobre las condiciones estériles, es muy posible fomentar el crecimiento de microorganismos ajenos a la producción de  $\alpha$  amilasa.

### 7.1 Esterilización del medio de cultivo.

La esterilización del medio de cultivo a nivel piloto generalmente se realiza de forma discontinua [60]. La temperatura recomendable para la esterilización discontinua es de 121 °C, diseñando el proceso adecuadamente para que esta temperatura permanezca el menor tiempo posible. El uso de vapor, es el método mas usado para esterilizar el medio de cultivo. La esterilización del medio de cultivo se realiza, ya sea en el interior del biorreactor o en un recipiente independiente. La elección del sistema depende de la escala de operación y las características del medio. Por lo común la esterilización se realiza en el interior del biorreactor. La esterilización del medio de cultivo se realiza por medio de inyección

directa de vapor y por el calentamiento indirecto con camisa de calentamiento a escala laboratorio y piloto.

## **7.2 Esterilización del biorreactor.**

Es necesario esterilizar el biorreactor si el medio de cultivo es esterilizado de forma continua o en un recipiente agitado independiente. La esterilización del biorreactor se puede efectuar mediante el esparcimiento de vapor en su interior y por todas las estradas y salidas. El vapor es inyectado normalmente bajo una presión de 15 psi por 20 minutos [55].

## **7.3 Esterilización del aire de fermentación.**

Dado a que el *Bacillus Licheniformis* es un microorganismo aerobio, su desarrollo metabólico requiere de elevadas cantidades de oxígeno. Por tal motivo se debe suministrar aire durante la fermentación productiva en condiciones estériles. La forma más rentable de obtener aire estéril para fermentaciones a escala piloto e industrial, es mediante el uso de filtros. La selección de los filtros, depende de la cantidad de microorganismos contaminantes en el aire (si se carece de datos experimentales, para fines de diseño, se puede adoptar el valor promedio de 3000 contaminantes/m<sup>3</sup>), y del diámetro de los contaminantes (células, esporas, bacteriofagos). Existen dos tipos de filtros, que pueden ser usados para la esterilización de aire que son:

*Filtros profundos.* Estos filtros están constituidos de techos empaquetados o rellenos de materiales fibrosos como fibra de vidrio, algodón, lana mineral, celulosa o fibra de asbesto. Las dimensiones de los orificios de estos filtros, varía entre los 1-15  $\mu\text{m}$ , alrededor de 10 veces superior al de las dimensiones de las bacterias y esporas que deben ser eliminadas. El uso de filtros profundos tiene el riesgo de no obstaculizar de forma satisfactoria el paso de material contaminante por el tamaño de sus orificios. Además los filtros profundos no funcionan bien si

existen grandes fluctuaciones en el caudal de aire o si el aire está húmedo. La condensación de líquido en el filtro aumenta la pérdida de carga, produce canalizaciones de flujo y proporciona una vía de escape para los microorganismos. La eficiencia del filtro está relacionado en términos generales con la profundidad del material de relleno [54]

*Filtros de cartucho.* También llamados filtros absolutos, están contruidos por membranas polimericas plegadas, esterilizables con vapor. Los orificios de las membranas oscilan entre los 0.45  $\mu\text{m}$  o incluso menores (lo cual impide casi de forma completa el paso de bacterias o esporas al medio de fermentación). La ventaja los filtros de cartucho, es su diseño compacto y su larga vida útil de hasta 50 ciclos de esterilización.

Un arreglo típico del tratamiento de aire a la entrada del biorreactor, consiste en lo siguiente [14,50]:

1. El aire antes de entrar al compresor, es hecho pasar por un filtro grueso, para separar las partículas más groseras.
2. El aire que deja el compresor tiene una temperatura de 130-160 °C, debido a la compresión adiabática.
3. El aire es retenido a esta temperatura por algunos segundos, provocando la inactivación de las células viables. El aire es enfriado cerca de los 80 °C.
4. El aire es tratado en un filtro coalescente con el fin de remover partículas de aceite y humedad. Este filtro muchas veces puede ser un filtro profundo.
5. Finalmente el aire es esterilizado ya sea por un filtro profundo o absoluto.

El tratamiento de los gases que son liberados del biorreactor, se hace necesario cuando se trabaja con microorganismos recombinantes o de alto riesgo. Por lo general el aire de salida posee un mayor número de contaminantes que a la entrada, por lo cual los filtros deben ser más eficientes que para la esterilización del aire de entrada.

## **8. INSTRUMENTACIÓN Y CONTROL.**

### **8.1 Control de los biorreactores.**

Para proporcionar el ambiente adecuado en un biorreactor, las propiedades del sistema deben estar monitorizadas para poder controlar cualquier desviación de los valores deseados, con el fin de mejorar el rendimiento de los procesos y poder alcanzar en el fermentador una operación uniforme y satisfactoria.

Pequeñas diferencias en aquellas variables de vital interés (entre ellas la temperatura, o la concentración de oxígeno disuelto) pueden alterar significativamente el metabolismo de las células, incluso llegando a inhibir de forma total la el crecimiento celular y la producción de enzimas.

El monitoreo de los biorreactores no es fácil, ya que se trata de sistemas biológicos los cuales dependen de diferentes variables que interactúan en un mismo sistema, además de que su comportamiento metabólico varía conforme transcurre el tiempo.

En la industria de la fermentación existen varios niveles de control de proceso; el más simple es el control manual que requiere de un operador humano para manipular los dispositivos como bombas, motores y válvulas. El control de retroalimentación automático (*feedback*), se utiliza para mantener los parámetros en sus valores prefijados. Debido al aumento en el uso de las computadoras en la industria de la fermentación, es posible utilizar estrategias avanzadas de control y optimización basadas en modelos de fermentación.

Cualquier intento de comprender o controlar el estado de una fermentación depende del conocimiento que se tenga sobre las variables críticas que afectan el proceso. Estos parámetros pueden agruparse en tres categorías:

- a) Físicos.
- b) Químicos.
- c) Biológicos.

A pesar de la importancia de la monitorización de la fermentación, no existen a escala industrial instrumentos, tablas o sensores capaces de dar una respuesta rápida, precisa y directa para muchas variables del proceso. Para lograr un control efectivo de la fermentación basado en datos medidos, el tiempo necesario para realizar la medida debe ser compatible con la velocidad de cambio de la variable que está siendo monitorizada.

Idealmente, las mediciones deberían realizarse *in situ* y en línea, es decir, en un punto cercano o dentro del propio reactor durante la operación, de manera que el resultado esté disponible inmediatamente para la acción de control.

El control de un parámetro particular se lleva a cabo con un sensor que mide la propiedad y con un controlador que compara esta medida con un valor fijo predeterminado y que activa el equipo hasta ajustar el valor de la propiedad de éste. El ajuste implica la modificación de estado de una válvula de apertura o la velocidad de una bomba dosificadora.

Las mediciones en línea para bioreactores a nivel piloto e industrial son normalmente la temperatura, la presión, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, el caudal, la velocidad de agitación, la potencia consumida, el nivel de espuma, el peso del medio de cultivo y la composición del gas.

Las mediciones fuera de línea se utilizan en las fermentaciones industriales para el análisis de las concentraciones de biomasa, carbohidratos, proteínas, fosfatos y lípidos, para la actividad enzimática y para la reología del caldo de cultivo.

### 8.1.1 Sistemas de control.

En la industria de la fermentación existen varios niveles de control de proceso, los cuales dependen de cuatro elementos básicos.

1. Una variable de proceso.
  2. Un elemento de medición.
  3. Un controlador.
  4. Un elemento de control final (actuador)
- a) *El control manual* es el sistema de control más simple, el cual requiere de un operador humano (controlador) para manipular los dispositivos de control final (bombas, válvulas, etc.) al registrarse desviaciones en el valor establecido o fijo de alguna variable de proceso.
- b) *El control automático* presenta diferentes modalidades, entre las más comunes se encuentran las siguientes:
1. En control automático de *retroalimentación*, el elemento sensor de medición, genera una señal de salida, el controlador compara la señal medida con un valor fijo (valor de consigna) deseado y produce una señal de salida para contrarrestar alguna diferencia entre los dos (error). El elemento final de control, recibe la señal de control y ajusta el proceso por la variación en la velocidad de una bomba o el cambio en la apertura de una válvula, causando el control en la propiedad monitoreada, restableciéndola al valor fijo preestablecido. Un esbozo simplificado del control de retroalimentación, se muestra en la figura 8.1.
  2. El control automático de *encendido y apagado*, es usado cuando una variable se desvía del punto de consigna ocasionando que el controlador accione el elemento de control final. En el control de encendido y apagado

se toleran pequeñas desviaciones del valor de consigna con el fin de evitar continuos encendidos y apagados y los problemas de retraso en las medidas. Este sistema de control, es usado cuando los dispositivos de control final son estrictamente de encendido y apagado, tal es el caso de bombas de velocidad fija.

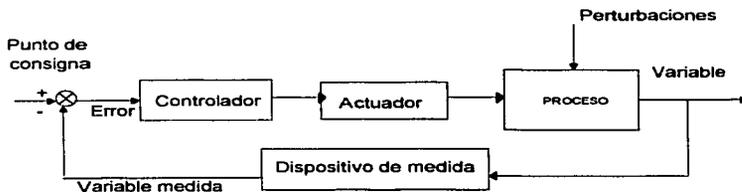


Fig. 8.1. Componentes de un sistema de control de retroalimentación [21]

3. El control automático *proporcional-integral-derivado*, es requerido para el control de aquellas variables que requieren de un dispositivo de control final de libre cambio, como el caso de válvulas de diferente abertura o bombas de velocidad variable. La función de control se determina en proporción al error, la integral del error y la derivada del error con respecto al tiempo.
- c) En el *control asistido por computadora* existe la posibilidad de usar las computadoras como controladores, con la opción de un monitoreo mas completo y global del proceso de fermentación. En la fig. 8.2 se muestra un esquema simplificado de control por computadora para una sola variable. Un sensor en el fermentador produce una señal la cual puede ser amplificada y llevada a una forma analógica correcta. En esta fase es necesario convertir la señal analógica a digital, la cual es canalizada a la computadora. En este punto es necesario un nexo (interface) que sirva de comunicación entre las señales

provenientes de los sensores del fermentador y los dispositivos de control final (bombas, válvulas, etc.). Las señales digitales provenientes de la computadora deben ser traducidas a señales análogas para activar los dispositivos de control final. La computadora está unida a un cronómetro, el cual determina la frecuencia con que se realizarán las mediciones desde los sensores.

Además del empleo de computadoras en los sistemas de fermentación es posible usar estrategias avanzadas de control y optimización basadas en modelos de fermentación. En los intentos más recientes de control de fermentación es necesario disponer de un modelo matemático razonablemente preciso de las reacciones y del reactor a utilizar. Mediante modelos del proceso es posible progresar desde el control medioambiental de los biorreactores hasta el campo de control biológico directo. El desarrollo de los modelos de fermentación está asistido por la información obtenida con las mediciones realizadas durante la operación del proceso. Los modelos son relaciones matemáticas entre variables. Normalmente los modelos se basan en una combinación de relaciones teóricas que proporcionan la estructura del modelo y una serie de observaciones experimentales que proporcionan los valores numéricos de los coeficientes. Para procesos biológicos, la especificación de la estructura del modelo puede ser difícil debido a la complejidad de los procesos celulares y al elevado número de factores ambientales que afectan el cultivo celular. Un problema común en los modelos de fermentación es que los parámetros necesarios para su utilización son difíciles de medir o varían con el tiempo.

Un sistema moderno y prometedor de control en las fermentaciones, es el uso de inteligencia artificial por el método de *redes neuronales*. Este sistema es particularmente válido para obtener información útil a partir de la experiencia previa. Las redes neuronales ofrecen la oportunidad de aprender a responder ante relaciones complejas, no lineales entre variables y pueden, por lo tanto, ser útiles en el desarrollo de modelos del proceso y el cálculo de parámetros desconocidos de la fermentación. [2]

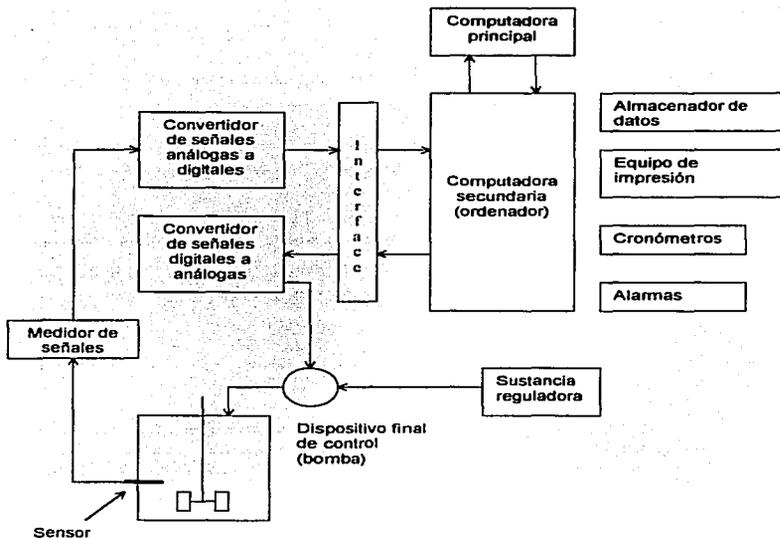


Fig. 8.2. Esquema simplificado de un sistema controlado por computadora. [50]

## 8.2 Instrumentación para el monitoreo del bioreactor.

### 8.2.1 Medición de parámetros fisicoquímicos en línea.

#### 8.2.1.1 Temperatura.

Muchos microorganismos tienen un determinado intervalo de temperatura para su actividad biológica óptima. La energía calorífica es rápidamente absorbida por la

célula, por lo que el control de la temperatura es un parámetro de regulación importante para el proceso. Para el registro de temperatura, los termómetros de resistencia y los termistores son los que se encuentran en la mayoría de las instalaciones [9] (ver apéndice 5).

#### *8.2.1.2 pH.*

El electrodo de vidrio es el elemento detector primario de las mediciones de pH. El principio de medición se basa en el desarrollo de un potencial en la membrana de vidrio sensible al pH, como resultado de la diferencia en la actividad del ión hidrógeno en la muestra y una solución estándar de referencia (solución de cloruro de potasio) contenida dentro del electrodo (Apéndice 5). El potencial del electrodo, proporciona un voltaje que se expresa como pH.

#### *8.2.1.3 Medición del oxígeno disuelto.*

Los sensores de medición de oxígeno disuelto (OD) consisten básicamente de una camisa de acero inoxidable o de cristal que contiene dos electrodos y un electrolito adecuado. Para separar los electrodos y los electrolitos del caldo de fermentación, el sensor está cubierto por una membrana (Apéndice 5). El oxígeno difunde a través de la membrana y se reduce en el cátodo, que está polarizado negativamente con respecto al ánodo. Esto produce una corriente que puede ser traducida como concentración de oxígeno.

Habitualmente se recurre al uso de sondas de tipo polarigráficas y galvánicas. La diferencia entre ellas, es que estas últimas son más baratas. Las sondas polarigráficas pueden ser fraccionalmente más rápidas y tener una vida útil más larga.

#### **8.2.1.4 Nivel de espuma.**

El control de la formación de espuma se puede realizar por métodos mecánicos, químicos o una combinación de los dos.

Podemos controlar la formación de espuma por 2 métodos o por una combinación de los dos (Apéndice 5):

- a) *Métodos mecánicos* los cuales consisten de adaptaciones de disco rotatorios montados sobre el eje principal de agitación. Estos dispositivos aseguran una buena eliminación de espuma, con la desventaja de que consumen elevadas cantidades de energía, lo cual se refleja en un incremento en los costos de operación.
  
- b) *Métodos químicos* se realizan con la ayuda de agentes antiespumantes, los cuales pueden

suministrados de forma automática mediante un instrumento conductor. Este instrumento puede ser de acero inoxidable, recubierto con teflón y con la punta descubierta. El instrumento es activado por la espuma al tocar la punta de la barra descubierta. Una señal proveniente del control, ordenará la adición de antiespumante por medio de una bomba (en pequeños fermentadores) o neumáticamente (en fermentadores de gran escala)

#### **8.2.1.5 Nivel de agitación.**

Para la medición de la velocidad rotacional, es común encontrar tacómetros, los cuales determinan las revoluciones por minuto mediante mecanismos de inducción, generación de voltaje, sensores de luz o fuerzas magnéticas (tacómetros eléctricos)

Los tacómetros eléctricos permiten una medición directa de las señales para alimentar los instrumentos registradores o controladores de panel. Los tacómetros eléctricos emplean un transductor que produce una señal analógica o digital como conversión de la velocidad de giro de la máquina. Generalmente estos dispositivos de medida se encuentran montados sobre el eje rotor de la máquina.

#### *8.2.1.6 Flujo de aire.*

En fermentaciones aerobias, el aire es transportado a través del fermentador para suministrar oxígeno y también para remover CO<sub>2</sub> lo cual de otro modo podría afectar la actividad metabólica. En reactores de columnas de burbujeo, promueve la mezcla del medio de cultivo. Normalmente las velocidades de flujo de aire se encuentran en el rango de 0.5-1.5 vvm (volúmenes de aire por volumen de reactor por minuto) [9]. Para el caso de *Bacillus Licheniformis*, su rango óptimo de aireación en cultivo batch se encuentra en 1.0 vvm. [57]. La medición del flujo de gas, incluye el suministro de aire al fermentador, para la toma de muestras de gas para el análisis y para el suministro de gas de amoníaco en el control de pH. Los instrumentos mas usados para la medición de flujo son los rotámetros y los medidores térmicos de flujo de masa (Apéndice 5).

#### *8.2.1.7 Medidor de nivel.*

Los indicadores de nivel, de la misma forma que los rotámetros, no necesitan cálculo para su selección, solo basta conocer las condiciones de proceso y características del medio de cultivo para su selección en manuales del proveedor. Estos pueden ser de nivel de vidrio y medidores de presión diferencial [23, Apéndice 5]

#### **8.2.1.8 Presión.**

En los procesos, el control de la presión ofrece condiciones de operación seguras, ya que cualquier recipiente, tubería o filtro tiene una presión máxima de operación. Las variaciones excesivas de presión no solo pueden provocar pérdidas de producto sino que también dañan al equipo y al personal de operación.

El biorreactor suele someterse a presiones de esterilización con el fin de prevenir posibles riesgos de contaminación por residuos remanentes. Algunas veces el medio de cultivo se esteriliza en el interior del biorreactor, por lo cual es indispensable el control de la presión, con el fin de evitar el deterioro de los componentes del medio de cultivo. Para el control de la presión suelen usarse manómetros de presión o de Bourdon [12, Apéndice 5].

#### **8.2.1.9 Análisis del gas de salida.**

El gas que abandona el reactor contiene diversos tipos de gases, dependiendo del tipo de reacción. En reacciones biológicas, los principales gases presentes en el gas de salida son  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . La determinación de las concentraciones de estos gases, es indicativo de la actividad metabólica presente en el interior del reactor durante la reacción. La diferencia del contenido de oxígeno a la entrada y en la corriente de salida, es igual a la cantidad de oxígeno transferido al sistema.

El contenido de oxígeno, se puede determinar por medio de analizadores de gas de tipo paramagnéticos. Los analizadores más populares son los de viento magnético (termomagnético) y el de deflexión (magnetodinámico) [5, Apéndice 5].

La medición de  $\text{CO}_2$  se puede realizar con analizadores de infrarrojos, los cuales consisten de una fuente de luz, una sección óptica y el sensor principal.

### *Espectrómetros de masas.*

La espectrometría de masas está basada en la separación de las moléculas ionizadas en el vacío. La separación basada en la relación de masa a carga se consigue instrumentos magnéticos o de cuadrupolo. Potencialmente los espectrómetros de masas pueden ser utilizados tanto para el análisis continuo de gases en línea como de líquidos. Para el análisis de líquidos, una sonda que soporte una fuerte membrana permeable, se inserta en el caldo de fermentación y las sustancias disueltas como el  $O_2$  y el  $CO_2$  y cualquier líquido de suficiente volatilidad son arrastradas fuera de la solución aplicando vacío. Los espectrómetros de masas, pueden también ser utilizados para el análisis simultáneamente de cualquier componente de la fase gaseosa; sin embargo en las fermentaciones está restringido tradicionalmente a oxígeno y bióxido de carbono (mas algunas veces  $CH_4$ ,  $N_2$  y  $H_2$ ) como un sofisticado analizador de gases. La velocidad de respuesta es de segundos, posee una mayor precisión y puede ser conectado a varios fermentadores a la vez. Su principal desventaja es el elevado costo comparado con los analizadores de  $O_2$ . La principal desventaja del espectrómetro de masas, es su elevado costo, alrededor de diez veces más que la de cualquier analizador de gas. [9]

### **8.2.2 Medición de parámetros fisicoquímicos fuera de línea [9,60].**

#### *8.2.2.1 Medición de la concentración celular.*

En la actualidad no existen métodos rápidos y confiables para saber la concentración de células bacterianas a lo largo del proceso de fermentación. Sin embargo existen métodos que pueden dar aproximaciones basándose en características físicas.

*a) Medición en peso seco.*

Este método consiste de la separación de las células del caldo de cultivo y su desecación (comúnmente en hornos de microondas). Los tiempos de respuesta son largos, de 20-30 min. La medición de peso seco es útil solo para los casos en que el contenido de sólidos sea bajo.

*b) Turbidez.*

El principio implicado es medir la turbidez de un caldo de fermentación en función de la cantidad de luz transmitida. El método está limitado a sistemas en los que la turbidez del caldo será solamente debida a las células. Por ejemplo en fermentaciones con bacterias o levaduras unicelulares.

*c) Calor metabólico.*

El calor metabólico puede ser relacionado al crecimiento, ya que este es un proceso exotérmico. La relación será empírica y los errores implicados considerables.

#### *8.2.2.2 Actividad enzimática.*

Las reacciones catalizadas por las enzimas pueden seguirse espectrofotométricamente, ya que muchos de los sustratos o productos de las enzimas absorben luz visible y no visible. Esta es la forma más sencilla y común de analizar enzimas, y consiste en obtener curvas completas mediante control directo y continuo de la reacción. La unidad estándar de la actividad enzimática es el katal, definido como la cantidad de actividad enzimática necesaria para convertir un mol de sustrato en producto por segundo.

### ***8.2.2.3 Composición química del caldo de fermentación.***

La determinación en las concentraciones de carbohidratos, es de primordial interés ya que representan la fuente de carbono. En cuanto a las proteínas, es necesario su monitoreo que vislumbra la cantidad global de proteínas (material celular, enzimas, etc.) en el caldo de fermentación. La principal desventaja de los métodos convencionales para la determinación de los componentes químicos, son los tardados tiempos de respuesta que pueden variar de 2 a 24 horas, lo cual no daría un control efectivo estrictamente hablando.

Otros sistemas de medición consisten en la utilización de dispositivos de muestreo automático unidos a un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, análisis de imágenes, citometría de flujo o fluorometría. Las desventajas de estas técnicas de trabajo son, que debe de disponerse de sistemas asépticos de muestreo sin taponamientos debidas a las burbujas o flóculos que interfieran en las lecturas de respuesta.

### ***8.2.2.4 Viscosidad del caldo de cultivo.***

Es necesario el conocimiento de la variación en las propiedades reológicas de los caldos de cultivo, ya que estas influyen en el consumo de la energía y por tanto en las velocidades de transferencia de masa y de calor. Por otro lado, se ha encontrado que para cultivos que contienen células en forma de agregados tienden a ser más newtonianos, como es el caso de los microorganismos del género *Bacillus* Spp. Contrario a lo que sucede con células que presentan crecimiento filamentosos.

Para la medición de la viscosidad es necesario llevar una muestra fuera del biorreactor, lo cual limita esta prueba a realizarse fuera de línea, en viscosímetros los cuales pueden ser de varios tipos, de acuerdo al tipo de fluido a medir la viscosidad (viscosímetros rotacionales, de cono y placa, de rodete, etc.).

## **9. SERVICIOS AUXILIARES.**

La producción de  $\alpha$  amilasa dentro del bioreactor, requiere de servicios auxiliares dentro de los cuales son de uso indispensable:

1. Agua de proceso.
2. Agua de enfriamiento.
3. Vapor de calentamiento.
4. Aire estéril comprimido.
5. Energía eléctrica.

En el apéndice 6 se especifican las características que estos servicios deben cumplir, además de su transporte dentro de la planta.

### **9.1 Agua de proceso y de limpieza.**

El agua de proceso puede ser definida como el agua que usada dentro del bioreactor. Este tipo de agua es usada para:

- a) La preparación del medio de cultivo.
- b) La preparación de soluciones reguladoras de pH.
- c) La limpieza del interior del bioreactor y tuberías.

### **9.2 Agua de enfriamiento.**

Dentro de la etapa de fermentación, es de uso indispensable agua de enfriamiento para:

- a) Enfriar el medio de cultivo después de su esterilización.
- b) Mantener la estabilidad térmica del medio de cultivo durante la fermentación.

### **9.3 Vapor de calentamiento.**

El vapor tiene varias funciones dentro de la etapa de fermentación, las cuales son:

- a) Esterilización del medio de cultivo.
- b) Esterilización de las líneas de proceso.
- c) Esterilización del interior del bioreactor.

### **9.4 Aire estéril comprimido.**

Los principales usos que tiene el aire estéril comprimido dentro de la producción de  $\alpha$  amilasa dentro del bioreactor son principalmente:

- Aire de fermentación.
- Medio impulsor en la adición de álcali, antiespumante e inóculo.
- Mantenimiento de la presión positiva dentro del bioreactor.

### **9.5 Energía eléctrica.**

La energía eléctrica es de uso indispensable, ya que tanto los sistemas automatizados como los sistemas de propulsión requieren de esta. Por lo cual los dispositivos que requieren de energía eléctrica son:

- Agitación del medio de cultivo.
- Transporte de fluidos de proceso.
- Monitoreo y control.
- Compresión de aire.
- Usos generales de planta.

## **10. PRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS INSTALACIONES DE LA PLANTA PILOTO QUE OPERA EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM**

Cerca de que se concluyera con el trabajo de tesis, se tuvo la oportunidad de visitar la planta piloto del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, donde se confirmaron algunas de las propuestas expuestas en el presente trabajo, además de que se pudo conocer de forma física el equipo de fermentación y los servicios complementarios.

A continuación se presentan imágenes del equipo con que cuenta dicho instituto en el orden en que una cepa es cultivada hasta su uso en el bioreactor de escala piloto.

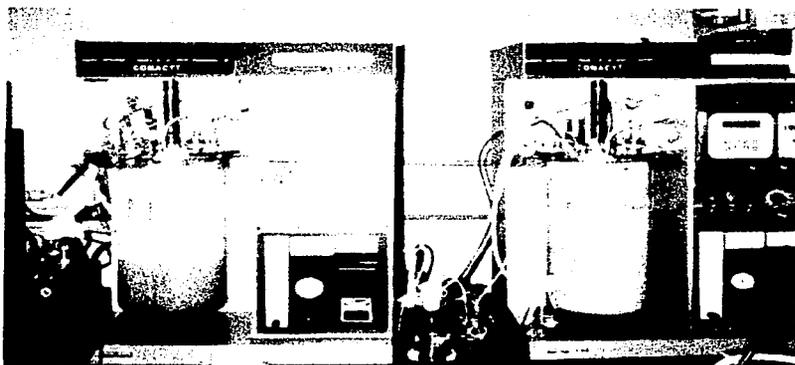
Las cepas liofilizadas, son inoculadas en un medio de cultivo apropiado dentro de frascos y bajo condiciones controladas en la incubadora que se muestra en la siguiente figura.



La incubadora, además de controlar la temperatura y el nivel de aireación, mantiene en agitación los frascos mediante una base móvil. enzimas extracelulares baratas y

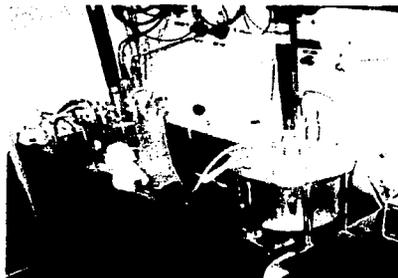
de gran producción, esta fase representaría el cultivo en bioreactor de pequeña escala [ver apartado 5.7.1]

Una vez que se obtiene la concentración de microorganismos adecuada, se procede a su cultivo a escala de pruebas. En esta escala se busca tener un registro mas completo sobre las variables del proceso de fermentación, con la finalidad de conocer el comportamiento del microorganismo dentro del sistema. La siguiente figura muestra bioreactores de tanque agitado con serpentines internos de enfriamiento y con puertos de tomas de muestras.

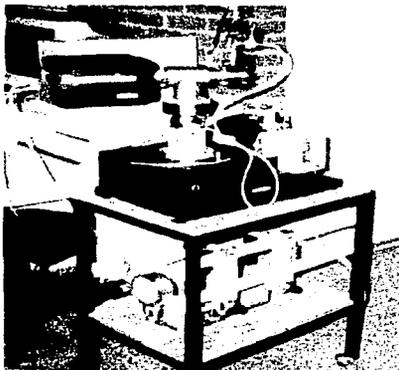


Cuando las fermentaciones excedan la capacidad de retiro de calor por el dispositivo de enfriamiento (serpentin), se puede contribuir con la inmersión del bioreactor en baños de agua de temperatura regulada como se muestra en la siguiente figura.

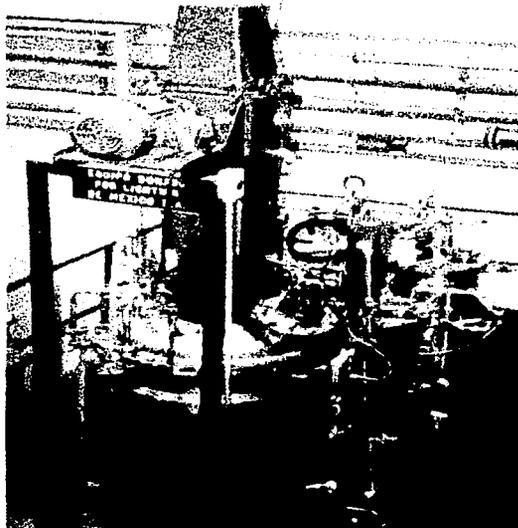
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



El análisis de gases generados durante la fermentación, es uno de los parámetros a ser monitoreados. El espectrómetro de masas es una herramienta útil, ya que sus datos son de forma rápida y precisa. El espectrómetro que se muestra en la figura siguiente puede conectarse en línea, para obtener toma de muestra continuas.



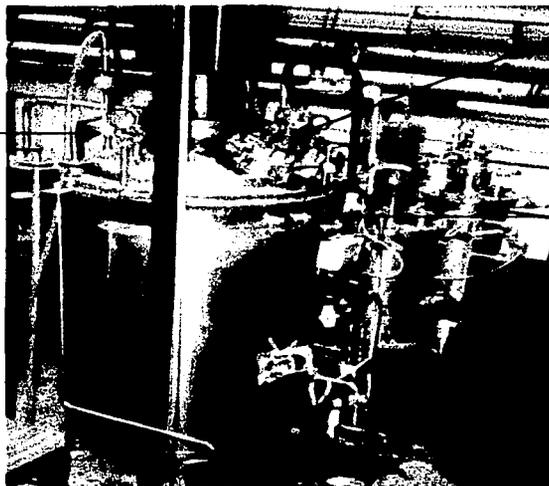
Una vez que se obtiene suficiente inoculo en el bioreactor de pruebas, se procede a inocular el cultivo en el bioreactor a nivel piloto. La siguiente figura presenta un bioreactor a escala piloto, con camisa externa de calentamiento y con sistema de agitación superior horizontal.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Dicho bioreactor cuenta con las sondas de medición de pH, oxígeno disuelto y temperatura, ubicadas en la parte media de nivel de líquido, como se muestra en la siguiente figura. En el mismo sitio donde la sondas son ubicadas, se encuentra un puerto para la toma de muestras, para hacer las pertinentes pruebas fuera de línea.

Puertos superiores de salida de aire y servicios generales



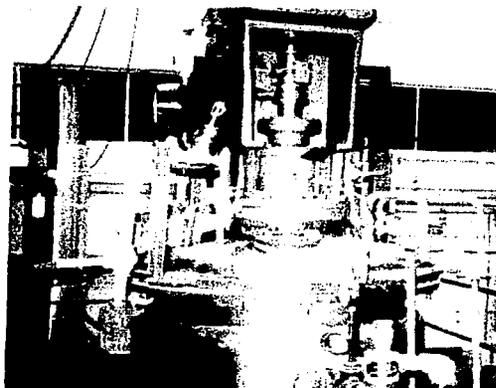
Mirilla

Puertos adicionales

Sondas y puerto de toma de muestras.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

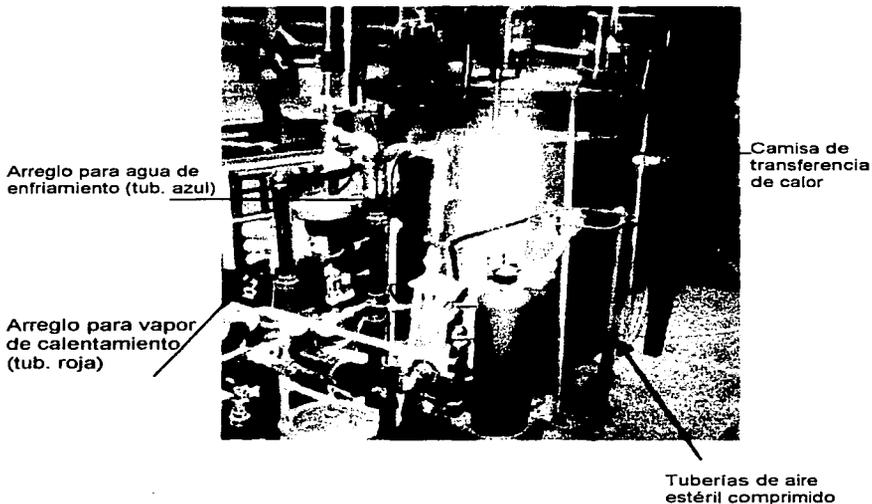
El bioreactor debe contar con un sello mecánico capaz de evitar la contaminación del interior del bioreactor por el paso de aire del medio ambiente por el espacio de agitación. La siguiente figura muestra un sello mecánico simple adaptado a la flecha del sistema de agitación.



Sello mecánico simple

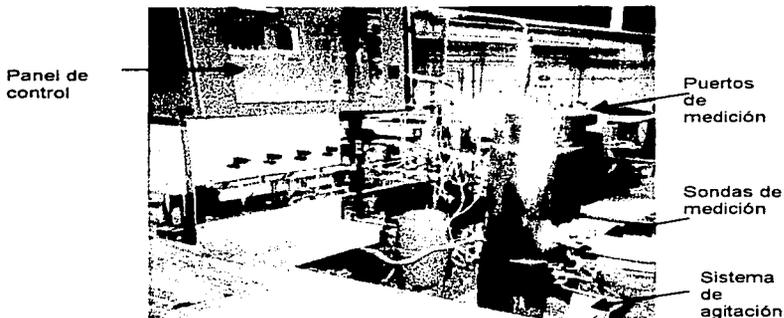
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El control de temperatura en las etapas de esterilización y fermentación, se requiere del circuito de calentamiento y enfriamiento que abastezca de agua fría así como de vapor de calentamiento a la camisa del bioreactor. La siguiente figura muestra el arreglo para tal circuito.

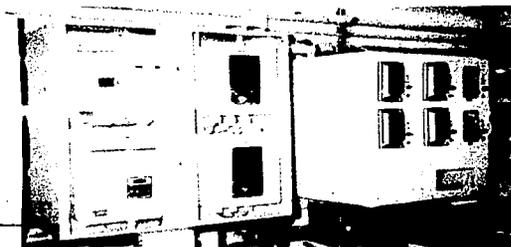


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para la producción de En bioreactores pequeños, es común que presenten sistemas de agitación ubicados en la parte inferior de los mismos, tal como se muestra en la siguiente figura.

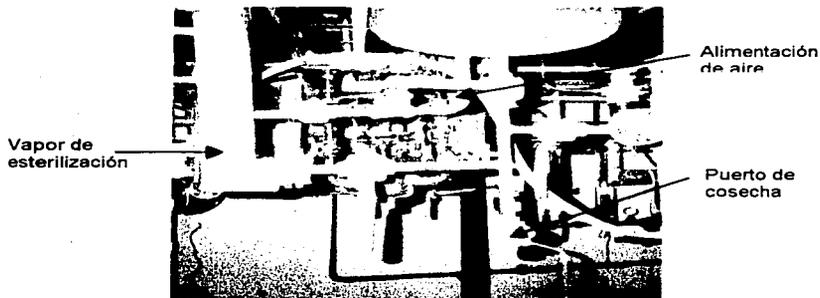


También en bioreactores de pequeña escala es factible contar con sistemas que regulen la velocidad de agitación por medio de sistemas que varíen en la corriente eléctrica. Muestra de estos paneles de control se muestran a continuación.

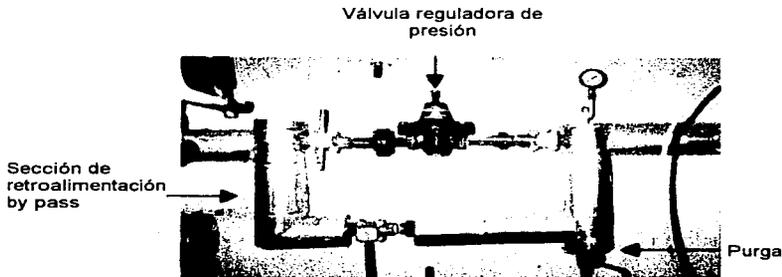


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El puerto de cosecha descrito en el apartado 6.3, esterilizable con vapor se visualiza mejor en la siguiente figura.



El vapor proveniente de la caldera para esterilización se debe someter a una reducción en su presión antes de llegar a la camisa del bioreactor. Un arreglo típico para la reducción de la presión se muestra en la siguiente figura.



En lo que concierne al tratamiento del aire de fermentación, este debe de pasar por una serie de filtros, como se mostró en el apartado 7.3. la siguiente figuras muestran de forma gráfica, el arreglo al que se hace mención en la figura 6.6.

Vapor de esterilización de los filtros

Aire estéril comprimido

Filtro profundo

Filtro de cartucho



Otra vista de la figura anterior.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 11. CONCLUSIONES.

1. El bioreactor a escala piloto para la producción de alfa amilasa, será de tipo tanque agitado ya que el *Bacillus licheniformis* es un microorganismo aerobio.
2. El modo de operación del mismo será intermitente o por lotes dado que presenta menos desventajas sobre el cultivo continuo; además de que algunas cepas de *Bacillus licheniformis* modificadas genéticamente son mas resistentes a la inhibición en la producción de  $\alpha$  amilasa por catabolitos, especialmente la glucosa.
3. La velocidad de agitación, es indirectamente proporcional a la velocidad de aereación, hecho por el cual se puede tener un menor gasto de energía por agitación, si se trabaja con caudales de aereación que estén por debajo del Na en un intervalo de 0.04 - 0.043, donde el agitador sufre de inundación.
4. De acuerdo al Na, la ecuación auxiliar que tiende a evitar la inundación del agitador por gas, es la velocidad superficial constante (ecuación 8.37). Con la ayuda de esta ecuación en el escalamiento se asegura que al aumentar la escala de fermentación, se aleje cada vez mas el valor límite de inundación, asegurando así una mayor transferencia de masa del agitador hacia el medio de cultivo.
5. La velocidad de agitación disminuye conforme la escala de fermentación aumenta para las tres ecuaciones auxiliares (ecuaciones 8.35, 8.37 y 8.38), con lo cual se denota que para el salto de escala de  $0.002 \text{ m}^3$  a  $1 \text{ m}^3$ , la potencia de agitación consumida por volumen pasa de  $0.706 \text{ HP/m}^3$  a  $0.08 \text{ HP/m}^3$ , lo cual representa una disminución del 91%
6. La potencia de compresión requerida para la compresión de aire es insignificante, aun frente a la potencia de agitación con aereación por lo que no afectaría de forma sustancial en los costos de operación, si los niveles de aereación aumentan al límite máximo en el cual el  $k_L a$  permanezca constante.
7. La potencia de agitación con y sin aereación es menor para los sistemas geométricos recomendados, al mismo tiempo que la transferencia de masa es

la misma. Para efectos de diseño del bioreactor a nivel piloto, su construcción estará basado sobre las relaciones geométricas recomendadas por fabricantes.

8. El bioreactor se considera como un recipiente sometido a presión, por exceder los 15 psia de presión que establece el código de construcción ASME, para que un recipiente deba ser considerado como tal.
9. El presente trabajo establece los métodos de control que aseguren la perpetuidad de las condiciones medioambientales para el crecimiento celular y la consecuente producción de  $\alpha$  amilasa, esperando que sirva como base para una posible construcción del bioreactor.
10. Este trabajo puede ser recomendado por los temas incluidos, como material de apoyo en las asignaturas de Tecnología de Alimentos IV e Ingeniería de Alimentos IV de la carrera de Ingeniero en Alimentos.

# ANEXOS

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **ANEXO 1: PROPIEDADES DEL MEDIO DE CULTIVO.**

### **A1.1 Tipos de medios de cultivo.**

Existen diferentes formas de clasificar los medios de cultivo y estos son [26]:

1. Según su proporción de agua.
  - a) Medios de cultivo sólidos.
  - b) Medios de cultivo líquidos o caldos.
  - c) Medios de cultivo semisólidos.
  
2. Según su composición que presenta.
  - a) Medios de cultivo naturales.
  - b) Medios de cultivo semisintéticos.
  - c) Medios de cultivo sintéticos.
  - d) Medios de cultivo complejos.

*Medios de cultivo sólidos.*

Son aquellos donde la proporción de agar, está siempre por encima del 15%. Es útil para el aislamiento, purificación y visualización del crecimiento de las colonias.

*Medios de cultivo líquidos o caldos.*

Estos medios no contienen agar y están compuestos, además de agua, de al menos una fuente de carbono, sales minerales y en algunas ocasiones según las características del medio, factores de crecimiento, vitaminas, peptonas, aminoácidos, etc.

***Medios de cultivo semisólidos.***

Estos suelen tener concentraciones de agar inferiores al 15%, lo cual le da una consistencia semisólida.

***Medios de cultivo naturales.***

Son aquellos donde cuyos componentes orgánicos e inorgánicos se encuentran en la naturaleza. Se suelen preparar artesanalmente y en general pueden estar constituidos por ciertos tejidos, líquidos orgánicos, etc.; por ejemplo: leche y suero sanguíneo.

***Medios de cultivo semisintéticos.***

Son medios donde su composición corresponde a estructuras naturales como levadura, malta, patata, sangre, leche, etc.; además de estar compuestos por materiales sintéticos o químicamente definidos, para el crecimiento microbiano.

***Medios de cultivo sintéticos.***

Corresponden a estructuras sintéticas mas o menos puras químicamente definidas, disueltas en agua destilada. Siempre deberán contener en su composición:

- Una fuente de carbono o azúcar.
- Una fuente de nitrógeno en forma orgánica o inorgánica.
- Compuestos minerales, y entre ellos oligoelementos.
- Factores de crecimiento que se incluirán si se requiere enriquecer el medio (químicamente corresponden a vitaminas, ciertos aminoácidos, bases pirimídicas o púricas, etc.).

*Medios de cultivo complejos.*

Se preparan de forma compleja a partir de tejidos animales y más raramente vegetales. Su composición no está exactamente definida, y sus materias primas suelen ser carne de músculo, de hígado, de corazón, clara de yema de huevo, azúcares, peptonas, etc.

**A1.2 Medio de cultivo para la producción de  $\alpha$  amilasa.**

El medio de cultivo usado para la producción de  $\alpha$  amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* es el siguiente, con la especificación de sus respectivos compuestos [5].

Tabla A1.1 Medio de cultivo, para la producción de  $\alpha$  amilasa.

Componente.	Cantidad %
Compuesto de harina de soya.	1.85
Levadura de cerveza.	1.50
Compuesto de sólidos secos destilados.	0.76
NZ amina (compuesto de caseína hidrolizada).	0.65
Lactosa.	4.75
Sulfato de magnesio hepta hidratado.	0.04
Antiespumante Hodag KG-1.	0.05
Agua.	90.40

Atkinson 1991

Es notorio que para la producción de enzimas, no es suficiente determinar la cantidad de sustratos necesarios para la formación de biomasa, sino que también se debe de considerar la formación de producto, dicho propiamente de la enzima  $\alpha$  amilasa. El medio de cultivo desglosado anteriormente y que se maneja industrialmente [5] presenta una fuerte inclinación por suministrar altos contenidos

proteicos, tal es el caso del uso de harina de soja y del compuesto de caseína hidrolizada.

Tabla A1.2 Ingredientes del medio de cultivo para la producción de  $\alpha$  amilasa.

Componente %	Compuesto de harina de soja	Compuesto de sólidos secos destilados	NZ amina (compuesto de caseína hidrolizada)
Aminoácidos			
Arginina	3.2	1.0	3.95
Cisteína	0.6	0.6	0.5
Glicina	2.4	1.1	1.8
Histidina	1.1	0.7	2.9
Isoleucina	2.5	1.6	4.6
Leucina	3.4	2.1	19.4
Licina	2.9	0.9	7.6
Metionina	0.6	0.6	2.4
Fenilalanina	2.2	1.5	5.0
Treonina	1.7	1.0	4.2
Triptofano	0.6	0.2	1.6
Tiroxina	1.4	0.7	3.2
Valina	0.6	1.5	2.4
Cenizas	5.7	8.0	5.5
Carbohidratos	-	68.9	-
Grasa	1.0	9.0	-
Fibra	3.0	4.0	-
Proteína	51.0-52.0	26.0	80
Sólidos	92.0	92.0	96.0
Vitaminas mg/kg.			
Biotina	-	2.9	-

Tabla A1.2 Continuación.

Colina	2750	4400	-
Acido nicotínico	20.9	110.2	-
Acido pantoténico	14.3	5.5	-
Piridoxina	-	19.8	-
Riboflavina	3.1	15.4	-
Tiamina	24	5.5	-

Atkinson 1991

### A1.3 Formulación del medio de cultivo.

La formulación de un medio de cultivo puede realizarse de dos formas: [43]

- a) Por medios químicamente definidos.
- b) Por medios de cultivo complejos.

#### A1.3.1 Medios de cultivo químicamente definidos.

Los medios definidos químicamente se usan comúnmente a escala laboratorio para estudiar los efectos que tienen los nutrientes sobre el crecimiento celular y sobre la biosíntesis de un metabolito de especial interés.

Estos medios se basan en la cantidad de elementos necesarios para la formación de material celular y formación de producto. Se debe de disponer de los datos de la composición básica elemental de los microorganismos para este método, como una condición necesaria. De una manera generalizada, se presentan los datos de la composición elemental para bacterias y levaduras (tabla A1.3).

Ejemplo:

Calcular la cantidad mínima de nitrógeno que se necesita para llegar a una concentración de 50 g de biomasa en peso seco por litro, a partir de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

$$\frac{50 \text{ g de biomasa en peso seco}}{\text{L}} \cdot \frac{0.125 \text{ g N}}{\text{g de biomasa en peso seco}} \cdot \frac{132 \text{ g (NH}_4\text{)SO}_4/\text{mol(NH}_4\text{)SO}_4}{28 \text{ g N/mol (NH}_4\text{)SO}_4/\text{L}} =$$
$$= \frac{29.5 \text{ g (NH}_4\text{)SO}_4}{\text{L}}$$

Tabla A1.3 Composición elemental típica de bacterias y levaduras.

Elemento	Bacteria	Levadura
	Cantidad celular en % de peso seco	
Carbón	48	48
Nitrógeno	12.5	7.5
	g/100 g peso seco	
Fósforo	2.5	0.4
Azufre	0.6	0.3
Potasio	2.3	1.4
Magnesio	0.8	0.3
Calcio	0.6	0.8
Hierro	0.01	0.15
Cobre	0.02	-
Manganeso	0.01	-

Rehm H. J 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Este tipo de aproximaciones pueden ser usadas para determinar los mínimos niveles de requerimiento para otro elemento de la tabla A1.3, a excepción del carbono, ya que este no solo es necesario para la formación de material celular, sino que también, es indispensable para la formación de producto y como fuente de abastecimiento de energía. El requerimiento mínimo de carbono, puede ser calculado usando el coeficiente de rendimiento de biomasa a partir de sustrato ( $Y_{xs}$ ). Si el valor de  $Y_{xs}$  es desconocido, este puede ser calculado, ya sea de la ecuación (A1.1), o bien mediante una esbozo gráfico experimental de cantidad de biomasa producida en función del requerimiento en los niveles de carbono.

#### A1.3.2 Medios complejos.

Los medios complejos son los que con más frecuencia se usan en las fermentaciones industriales. Estos medios contienen usualmente materiales crudos económicos o subproductos de carne, quesos, granos, y fibras procesadas. La tabla 4.4, resume algunos de estos materiales. Muchos de estos materiales, proveen de más de un solo nutriente, tal como se muestra en la tabla A2.2.

Tabla A1.4 Nutrientes usados frecuentemente en procesos comerciales de fermentación.

Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno
Cerelosa (glucosa comercial).	Harina de semilla de algodón.
Glicerol.	Harina de semilla de soya.
Melazas.	Harina de cacahuete.
Aceites (soja, maíz y semilla de algodón).	Destilados solubles secos.
Almidón de maíz, dextrinas e hidrolasas.	Levadura integral, extractos de levaduras.
Suero (65% de lactosa).	Líquido de maíz macerado o su polvo.
Alcoholes (tales como metanol).	Harina de gluten de maíz.
	Urea.

	Harina de linaza.
	Sulfato de amonio.
	Harina de pescado.
	Gas amonio.

Rehm H. J 1993

#### **A1.4 Estequiometría de la reacción.**

La estequiometría de la reacción es uno de los pilares para el diseño de cualquier tipo de reactor biológico. Establece los elementos para el diseño apropiado del medio de cultivo a ser usado en el proceso fermentativo. Simultáneamente con los balances de materia, la estequiometría ofrece los medios para visualizar satisfactoriamente la función de un proceso, y puede utilizarse para medir variables muchas veces difíciles de medir (gases liberados o absorbidos). Junto con las consideraciones termodinámicas, vislumbra el rango de posibles rendimientos para un determinado sistema.

Mientras que para reacciones químicas comunes, su estequiometría es relativamente fácil de determinar, y puede ser conocida con precisión, para las reacciones biológicas no sucede así; ya que estas se encuentran llenas de suposiciones e incertidumbres. Es casi imposible de registrar todos los componentes de un medio complejo y solo parte de los productos generados son reconocidos. Agregando la actividad de los cambios del medio de cultivo durante las diferentes fases de crecimiento.

A pesar de su complejidad y de que existen miles de reacciones intracelulares, el crecimiento de las células y formación de productos obedece a la ley de conservación de la materia. Todos los átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y otros elementos consumidos durante la reacción biológica se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

incorporan a las diferentes células o se expulsan como productos. Los elementos mayoritarios como el C, H, O y N, son tomados en cuenta para la representación estequiométrica de la reacción debido a que aportan la mayoría del material metabolizado por los organismos vivos.

La ecuación generalizada que representa la reacción de consumo de sustrato, para la formación de material celular y formación de producto extracelular, se resume a continuación. [5]



Donde:

$\text{CH}_s\text{H}_n\text{N}_b\text{O}_s\text{O}_p\text{P}_p\text{S}_s$  = fórmula química que representa al sustrato.

$\text{CH}_b\text{H}_n\text{N}_b\text{O}_b\text{O}_p\text{P}_p\text{S}_s$  = fórmula química que representa la biomasa seca.

$\text{CH}_p\text{H}_n\text{N}_p\text{O}_p\text{O}_p\text{P}_p\text{S}_s$  = fórmula química que representa el producto extracelular.

$a, b, c, d, e, f, g, h$  = coeficientes estequiométricos.

subíndices: s, b, p, representan la cantidad de átomos presentes en la fórmula del sustrato, biomasa y producto respectivamente.

subíndices: H, N, O, P, y S: átomos de hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre respectivamente.

Los coeficientes  $e$  y  $f$ , suelen también ser nombrados como coeficientes de rendimiento de biomasa y productos respectivamente ( $Y_{XS}$  y  $Y_{PS}$ ), por peso molecular de fórmula de un solo carbono, esto es:

$$Y_{xs} = \frac{\text{gramos de células producidas}}{\text{gramos de sustrato consumido}} \quad (\text{A1.2})$$

$$Y_{xs} = e \frac{\text{masa molecular de la célula}}{\text{masa molecular del sustrato}} \quad (\text{A1.3})$$

$$Y_{ps} = \frac{\text{gramos de producto formado}}{\text{gramos de sustrato consumido}} \quad (\text{A1.4})$$

$$Y_{ps} = f \frac{\text{masa molecular del producto}}{\text{masa molecular del sustrato}} \quad (\text{A1.5})$$

Además de los rendimientos de biomasa y producto que facilitan el cálculo de los coeficientes estequiométricos, se hace uso de otra relación que puede ser de gran ayuda; el coeficiente respiratorio (RQ) de la reacción.

$$\text{RQ} = \frac{\text{moles de CO}_2 \text{ producidos}}{\text{moles de O}_2 \text{ consumidos}} = \frac{g}{d} \quad (\text{A1.6})$$

Para determinadas especies de microorganismos, su composición celular, depende de las condiciones de cultivo y del sustrato utilizado. Sin embargo cabe destacar que las fórmulas químicas son muy similares para células y condiciones muy diferentes, por ello, cuando no se dispone de la composición de las células en específico, puede usarse como fórmula general: [21]



El peso molecular medio de la biomasa basado en estos 4 elementos es por lo tanto 24.6, aunque existe un remanente de 5-10 % de ceniza residual que no se incluye en la fórmula.

Cabe hacer la aclaración de que la ecuación (A1.1) no es válida si la formación de producto no está asociada directamente al crecimiento. [21] El problema de la ecuación (A1.1) radica en conocer los coeficientes estequiométricos. Se puede

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

hacer uso de los balances elementales, pero la presencia de agua, que generalmente se encuentra en exceso y ya que los cambios de concentración que presenta son muy difíciles de medir o verificar experimentalmente, los balances de H y O, pueden presentar dificultades. En su lugar, un principio muy útil es la conservación de potencia reductora o electrones disponibles, la cual puede utilizarse para calcular relaciones cuantitativas entre sustratos y productos.

Los electrones disponibles, se refieren al número de electrones disponibles para transferir del oxígeno en la combustión de una sustancia a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y compuestos que contengan nitrógeno. El grado de reducción ( $\gamma$ ) se define como el número de equivalentes de electrones disponibles en aquella cantidad que contenga 1 gramo átomo de carbono. O bien es el número de equivalentes de oxígeno requerido para la completa oxidación de una sustancia orgánica que contenga un gramo átomo de carbono. La tabla A1.5 presenta algunos ejemplos del grado de reducción para algunos sustratos y microorganismos [21].

#### *A1.4.1 Demanda teórica de oxígeno*

La demanda de oxígeno, es un parámetro importante en las biotransformaciones ya que el oxígeno a menudo es el sustrato limitante en las fermentaciones aerobias. La demanda de oxígeno esta representada por el coeficiente estequiométrico  $d$ , en la ecuación (A1.1). Las necesidades de oxígeno están directamente relacionadas con los electrones disponibles para la transferencia de oxígeno, por lo que la demanda de oxígeno puede derivarse a partir de un balance de electrones apropiado, esto es: [52]

$$\gamma_S - 4d = e_{YB} + f_{YP} \quad (\text{A1.8})$$

Tabla A1.5 Grado de reducción y peso de un equivalente de carbono o mol de algunos sustratos y biomasa

Compuesto	Fórmula molecular	Grado de reducción $\gamma$	Peso molecular
Biomasa	$CH_{1.44}N_{0.18}O_{0.42}$ Porosa/Sucro	4.17 (NH <sub>3</sub> )	24.5
		4.65 (N <sub>2</sub> )	
		5.45 (HNO <sub>3</sub> )	
Metano	CH <sub>4</sub>	8.0	16.0
n-alcano	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	6.13	14.1
Metanol	CH <sub>3</sub> O	6.0	32.0
Etolanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	6.0	23.0
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	4.67	30.7
Manolitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	4.33	30.3
Acido Acético	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4.0	30.0
Acido láctico	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	4.0	30.0
Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	4.0	30.0
Formaldehido	CH <sub>2</sub> O	4.0	30.0
Acido gluconico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	3.67	32.7
Acido succinico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	3.50	29.5
Acido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	3.0	32.0
Acido málico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	3.0	33.5
Acido fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.0	46.0
Acido oxálico	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1.0	45.0

Doran 1995

Donde  $d$  se define entonces como:

$$d = 1/4 (\gamma_S - e\gamma_B - f\gamma_P) \quad (A1.9)$$

Donde:  $\gamma_S$  = grado de reducción del sustrato.

$\gamma_B$  = grado de reducción de la biomasa.

$\gamma_P$  = grado de reducción del producto.

Una forma rápida de conocer la cantidad de oxígeno requerido para llevar a cabo la combustión completa del sustrato en cuestión, se puede determinar a través de la ecuación (A1.9); no obstante sin conocer las cantidades de la fuente de nitrógeno, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O que intervienen en la reacción. Para aplicar la ecuación (A1.9) es necesario conocer los grados de reducción del sustrato, biomasa y producto, así como los rendimientos de biomasa y producto ( $e$  y  $f$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### A1.4.2 Rendimiento máximo posible.

Los electrones disponibles son conservados durante una reacción bioquímica, si se realiza un balance de electrones en la ecuación (A1.1) o si reordenamos la ecuación (A1.9), se deduce que el reparto de electrones en el sustrato es:

$$\frac{4d}{Y_S} + \frac{eY_B}{Y_S} + \frac{fY_P}{Y_S} = 1 \quad (\text{A1.10})$$

Donde:  $4d/Y_S = \eta_S$  es la fracción de electrones disponibles del sustrato, los cuales son transferidos al oxígeno. También, representa la cantidad de energía del sustrato convertida en calor.

$eY_B/Y_S = \eta_B$  es la fracción de electrones transferidos a la biomasa.

$fY_P/Y_S = \eta_P$  es la fracción de electrones transferidos al producto.

La ecuación (A1.10), puede entonces ser utilizada para conocer los rendimientos de biomasa y producto a partir de sustrato.

En ausencia de formación de producto, y si todos los electrones se utilizaran para la síntesis de biomasa,  $\eta_B$  sería igual a la unidad, bajo estas condiciones, el valor máximo del coeficiente estequiométrico  $e$  es:

$$e_{\max} = Y_S/Y_B \quad (\text{A1.11})$$

$e_{\max}$  puede convertirse a rendimiento de biomasa con unidades de masa mediante la ecuación (A1.3). Entonces incluso, si no se conoce la estequiometría del crecimiento, el límite superior de rendimiento de biomasa puede calcularse rápidamente a partir de la fórmula molecular del sustrato y del producto. Los rendimientos máximos de biomasa pueden expresarse en términos de masa ( $Y_{S, \max}$ ) o como el número de átomos de carbono en la biomasa por

átomo de carbono de sustrato consumido ( $e_{max}$ ). Estas cantidades, se denominan algunas veces como rendimientos termodinámicos máximos. La tabla 4.6 presenta valores de rendimiento termodinámico máximo de biomasa, respecto a algunos sustratos.

Tabla A1.6 Rendimientos termodinámicos máximos de biomasa.

Sustrato	$\gamma_s$	Rendimiento termodinámico máximo correspondiente a $\eta_B = 1$	
		$e_{max}$	$Y_{x,s,max}$
<b>Alcanos</b>			
Metano	8.0	1.9	2.9
Hexano (n)	6.3	1.5	2.6
Hexadecano	6.1	1.5	2.5
<b>Alcoholes</b>			
Metanol	6.0	1.4	1.1
Etanol	6.0	1.4	1.5
Etilén glicol	5.0	1.2	0.9
Glicerol	4.7	1.1	0.9
<b>Carbohidratos</b>			
Formaldehído	4.0	0.95	0.8
Glucosa	4.0	0.95	0.8
Sacarosa	4.0	0.95	0.8
<i>Almidón</i>	4.0	0.95	0.9
<b>Ácidos orgánicos</b>			
Ácido fórmico	2.0	0.5	0.3
Ácido acético	4.0	0.95	0.8
Ácido propiónico	4.7	1.1	1.1
Ácido láctico	4.0	0.95	0.8
Ácido fumárico	3.0	0.7	0.6
Ácido oxálico	1.0	0.24	0.1

Doran (1995)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **ANEXO 2: CINÉTICA DE LAS REACCIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.**

### **A2.1 Cinética de la reacción.**

La cinética de la reacción en fermentaciones establece la velocidad a la cual los reactivos o componentes del medio de cultivo (sustratos) son aprovechados para obtener productos (biomasa, metabolitos, CO<sub>2</sub>, etc.). La velocidad de la reacción se define como la cantidad de un componente A, que se convierte o produce por unidad de tiempo, en un sistema que reacciona químicamente.

#### **A2.1.1 Orden de reacción.**

En reacciones que proceden por un solo paso, las velocidades de reacción son proporcionales a las concentraciones de los reactivos elevadas a una potencia, por lo que es conveniente hablar de orden de reacción. Las reacciones que se llevan cabo por etapas múltiples en serie o en paralelo comúnmente no pueden expresarse mediante este sencillo esquema, y se denominan reacciones complejas. [10,38]

##### *A2.1.1.1 Cinética de orden cero.*

Si una reacción obedece una cinética de reacción de orden cero, la velocidad de reacción, es independiente de la concentración de reactante, donde:

$$r_A = k_0 \quad (A2.1)$$

Donde:

$r_A$  = velocidad volumétrica de reacción con respecto a un reactante A.

$k_0$  = constante de velocidad de orden cero.

Si la reacción es de orden cero, la velocidad será constante e igual a  $k_0$ , durante el transcurso de toda la reacción. Una representación de  $C_A$  (concentración de reactante A), en función del tiempo e integrado con:

$$r_A = -\frac{dC_A}{dt} \quad (\text{A2.2})$$

La condición inicial es que a  $t = 0$ ,  $C_A = C_{A0}$  = concentración inicial de reactante A.

$$C_A = \int -r_A dt = C_{A0} - k_0 t \quad (\text{A2.3})$$

Donde  $k_0$  es igual a la pendiente, si la ecuación se ajusta a una línea recta como se muestra en la fig. A2.1. El valor de  $k_0$  depende de la concentración de catalizador presente de forma directamente proporcional.

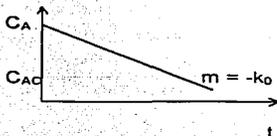


Fig. A2.1. Cinética de orden cero.

#### A2.1.1.2 Cinética de primer orden.

Si una reacción obedece a una cinética de primer orden, la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de reactante es:

$$r_A = k_1 C_A \quad (\text{A2.4})$$

Donde  $k_1$  es la constante de velocidad de primer orden, donde su valor depende de la concentración del catalizador.

Integrando la ecuación (A2.4) con la ecuación (A2.2) y considerando que a  $t = 0$ ,  $C_A = C_{A0}$  se tiene que:

$$\ln C_A = \ln C_{A0} - k_1 t \quad (\text{A2.5})$$

Por lo tanto al representar  $\ln C_A$  en función del tiempo se obtiene una línea recta de pendiente  $-k_1$  como se muestra en la fig A2.2.

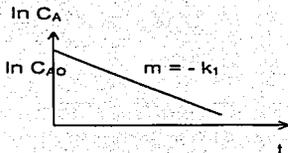


Fig. A2.2 Cinética de orden uno.

#### A2.1.1.3 Cinética de orden dos.

En este tipo de reacciones, la velocidad de reacción está sujeta a dos casos que son:

- La velocidad de reacción es proporcional al producto de dos concentraciones iguales.
- La velocidad de reacción es proporcional al producto de dos concentraciones diferentes.

a) Si las concentraciones son iguales la relación entre la velocidad de reacción, la concentración de reactante es:

$$r_A = k[C_A][C_B] \quad (\text{A2.6})$$

o bien

$$r_A = k[C_A]^2 \quad (\text{A2.7})$$

Integrando la ecuación (A2.7) y tomando las consideraciones de que a  $t=0$ , la concentración de reactivo  $C_A = C_{A0}$ , se llega a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_{A0}} - k_2 t \quad (\text{A2.8})$$

Donde  $k_2$  = constante de velocidad de segundo orden.

Por lo tanto al representar  $\frac{1}{C_A}$  frente al tiempo se obtiene una línea recta con pendiente  $-k_2$  como se muestra en la fig. A2.3

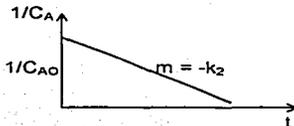


Fig. A2.3 Cinética de orden dos para concentraciones iguales de reactivo.

b) Si las concentraciones son diferentes la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de reactante es:

$$r_A = k_2 [C_A][C_B] \quad (\text{A2.9})$$

Integrando la ecuación (A2.9) y considerando que a  $t=0$ ,  $C_A=C_{A0}$ ,  $C_B=C_{B0}$ , se llega a la siguiente ecuación.

$$\frac{1}{[A_0] - [B_0]} \ln \frac{[B][B_0]}{[A][A_0]} = -k_2 t \quad (\text{A2.10})$$

Representando las concentraciones de los reactantes frente al tiempo, nos da una línea recta con pendiente  $-k_2$ , como se muestra en la fig. A2.4.

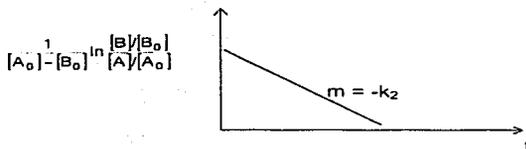


Fig. A2.4 Cinética de orden dos para concentraciones diferentes de reactivo.

#### A2.1.1.4 Cinética de orden "n".

Si en una reacción se presentan concentraciones iguales de más de dos reactivos, la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de reactante es:

$$-\frac{dC_A}{dt} = k_n (C_A)^n \quad (\text{A2.11})$$

Integrando la ecuación (A2.11) y considerando que a  $t=0$ ,  $C_A=C_{A0}$ , se tiene:

$$\frac{1}{(1-n)} \left[ \frac{1}{(C_A)^{n-1}} - \frac{1}{(C_{A0})^{n-1}} \right] = -kt \quad (\text{A2.12})$$

#### A2.2 Cinética general de reacción para sistemas biológicos.

La cinética de muchas reacciones biológicas, por lo general obedece la tendencia de orden cero, primer orden o una combinación de ellos, denominada cinética de Michaelis-Menten. [21]

### A2.2.1 Cinética de Michaelis-Menten.

La cinética de la mayoría de las reacciones enzimáticas se ajusta apropiadamente a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$r_A = \frac{V_{\max} C_A}{K_m + C_A} \quad (A2.13)$$

Donde:

$r_A$  = velocidad volumétrica de reacción.

$V_{\max}$  = velocidad máxima de reacción a concentración infinita de reactante.

$K_m$  = constante de Michaelis-Menten para el reactante A.

La constante de Michaelis-Menten es igual a la concentración de reactante a la que  $r_A = V_{\max} / 2$ .  $K_m$  y otras propiedades de las enzimas, dependen de la fuente de procedencia [cap. I, apartado 3]

Si se adaptan los símbolos convencionales para las reacciones biológicas y se denomina al reactante A como sustrato, la ecuación (A2.13) puede escribirse como comúnmente es conocida.

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (A2.14)$$

Donde:

S = concentración de sustrato.

v = velocidad volumétrica de reacción.

La cinética de Michaelis-Menten también puede representarse en función de las constantes de velocidad de reacción correspondiente a la reacción enzimática siguiente:



Donde:

E = enzima.

S = sustrato.

P = producto.

E-S = complejo enzima sustrato.

$k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  = constantes de velocidad de reacción.

Bajo estos términos la ecuación de Michaelis-Menten toma la siguiente forma:

$$V = \frac{k_2 e S}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S} \quad (A2.16)$$

Donde:  $e$  = concentración de enzima activa.

$$V_{\max} = k_2 e$$

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (A2.17)$$

#### A2.2.2 Cinética de crecimiento celular.

La cinética de crecimiento celular se expresa mediante ecuaciones similares a las que rigen la cinética enzimática. Vista de una forma matemática, existe poca diferencia entre las ecuaciones cinéticas para enzimas y células. El crecimiento celular en cultivo batch, presenta diversas fases de crecimiento: 1. Fase lag en la cual se sintetizan las enzimas requeridas para la evolución en el medio de

crecimiento, 2. Fase exponencial o log o en algunos casos llamada también fase de crecimiento equilibrado, ya que los nutrientes se consumen continuamente y los productos se acumulan, por lo cual el medio cambia continuamente, 3. Fase estacionaria en esta fase no se registra un crecimiento neto a causa de la disminución de algún nutriente esencial, formación de productos tóxicos o de un cambio físico (temperatura, pH, etc.), 4. Fase de declinación en la cual la rapidez de muerte celular aumenta y se refleja en la disminución de la densidad de células. Las diferentes fases de crecimiento se representan en la fig. A2.5.

Durante la fase exponencial, se presenta la velocidad máxima de crecimiento sobre un sustrato en particular. El incremento en población celular (biomasa) registrando en este periodo, está descrito por el tiempo requerido para duplicar la masa celular o el número de células, también llamado tiempo de duplicación, el cual es constante. El crecimiento exponencial se describe mediante la siguiente ecuación (5.19).

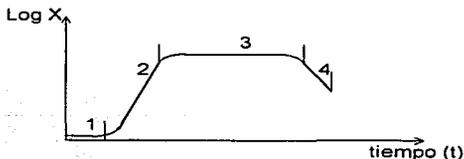


Fig. A2.5 Fases de crecimiento microbiano. [5]

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

(A2.19)

Donde:

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento ( $t^{-1}$ ).

X = concentración de biomasa (g/l).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Dado a que el número de células (N) es directamente proporcional a X se tiene que:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (\text{A2.20})$$

La ecuación (A2.19) es la forma diferencial de la ecuación de crecimiento y se puede usar para describir el crecimiento en cualquier etapa de la curva de crecimiento. Esta misma ecuación presenta una gran similitud con la ecuación (A2.4), con lo cual se puede considerar como una reacción autocatalítica de primer orden [21].

El integrando de la ecuación (A2.19) se aplica para conocer la concentración de biomasa a un determinado tiempo, donde la velocidad de crecimiento es constante, quedando de la siguiente forma:

$$\ln \frac{(X)}{(X_0)} = \mu t \quad (\text{A2.21})$$

Donde  $X_0$  es la concentración de biomasa a tiempo cero.

El tiempo de duplicación será:

$$t_d = \ln \frac{2}{\mu} \quad (\text{A2.22})$$

El número de duplicaciones en el periodo exponencial puede aproximarse mediante:

$$n = \frac{t}{t_d} \quad (\text{A2.23})$$

Donde  $n$  es el número de duplicaciones,  $t$  es el tiempo total que dura la fase exponencial.

### **A2.3 Factores que afectan la cinética de crecimiento celular.**

#### *A2.3.1 Efecto de la concentración de sustrato.*

La velocidad específica de crecimiento de células durante las fases de crecimiento y deceleración de un cultivo discontinuo, depende de la concentración de nutrientes presentes en el medio. De tantos nutrientes, solo uno es el que ejerce un efecto dominante sobre la velocidad de crecimiento y se denomina sustrato limitante del crecimiento, el cual comúnmente es una fuente de carbono, nitrógeno u oxígeno.

La velocidad específica de crecimiento  $\mu$  y la concentración de sustrato  $S$  se describe por medio de la ecuación de Monod, la cual es una derivación de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\mu = \frac{(\mu_{\max} S)}{K_s + S} \quad (\text{A2.24})$$

Donde:

$\mu_{\max}$  = velocidad máxima de crecimiento celular, equivalente a la velocidad de crecimiento exponencial cuando  $S \gg K_s$ .

$S$  = concentración de sustrato.

$K_s$  = constante de Monod que representa la cantidad de sustrato que produce la mitad de  $\mu_{\max}$ . Fig. A2.6.

La ecuación de Monod es válida únicamente para crecimiento equilibrado (la célula es capaz de mantener su composición invariable a pesar de las variaciones producidas en el ambiente que la rodea) y cuando se tienen niveles de sustrato extremadamente bajos. Si el incremento se ve inhibido por concentraciones altas

de sustrato o producto, deben añadirse otros términos a la ecuación de Monod, para tener en cuenta estos efectos.

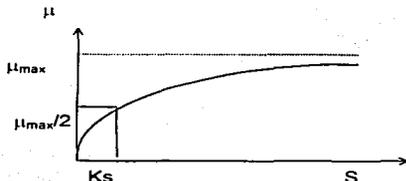


Fig. A2.6 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento. [61]

$\mu_{max}$  y  $K_s$  son parámetros intrínsecos del sistema célula - sustrato. La medición de estos puede realizarse por los siguientes métodos:

a) Representación de Lineweaver-Burk. ( No aplicable a bajas concentraciones de sustrato)

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max} S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (A2.25)$$

b) Representación de Eadie-Hofstee.

$$\frac{\mu}{S} = \frac{\mu_{max}}{K_s} - \frac{\mu}{K_s} \quad (A2.26)$$

c) Representación de Langmuir.

$$\mu = \frac{K_s}{\mu_{\max}} + \frac{S}{\mu_{\max}} \quad (\text{A2.27})$$

El valor de  $\mu_{\max}$  puede obtenerse de una manera sencilla, si se determina la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial.

### A2.3.2 Efecto de la temperatura.

Los microorganismos, dependiendo de su clase, presentan una temperatura óptima de crecimiento. La influencia de la velocidad de crecimiento, se visualiza mejor mediante una gráfica de Arrhenius de  $\mu$  en función del recíproco de la temperatura. Una curva típica es como la que se muestra en la fig. 5.7.

Donde se puede visualizar que a mayor temperatura la velocidad específica de crecimiento tiende a disminuir dado a que aumenta la muerte celular.

La ecuación que representa el crecimiento neto está dado por:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d)X \quad (\text{A2.28})$$

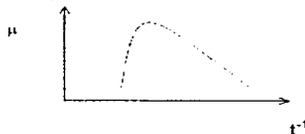


Fig. A2.7 Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la temperatura.

Donde  $k_d$  es la velocidad específica de muerte celular. La ecuación descrita por Arrhenius es entonces:

$$\frac{dX}{dt} = \left[ A e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} - A' e^{\left(\frac{-E_d}{RT}\right)} \right] X \quad (A2.29)$$

Donde:

$E_a$  = energía de activación.

$E_d$  = energía de activación para muerte celular (Kcal/g).

$R$  = constante universal de los gases (Kcal/g°K).

$T$  = temperatura absoluta (°K).

$A$  y  $A'$  = constantes de Arrhenius.

El aumento de la rapidez de mortalidad y disminución de la velocidad específica de crecimiento es ocasionado por la desnaturalización de proteínas. A bajas temperaturas, los mecanismos regulatorios de la célula son afectados, además de las limitaciones difusionales de nutrientes al interior de la célula [52]

De manera aproximada se puede decir que por cada 10°C, la velocidad específica de crecimiento sufre una duplicación en su valor. [2]

### A2.3.3 Efecto del pH.

Los cambios en el pH del medio de cultivo también afecta a la velocidad específica de crecimiento, pero esta puede sufrir pocos cambios si el pH se mantiene en un intervalo de 1-2 unidades, si se sobrepasa este intervalo, el valor de la velocidad específica de crecimiento puede variar drásticamente.

Como alternativa para eliminar los problemas de fluctuación de pH, se puede usar soluciones amortiguadoras, con la desventaja de incrementar los gastos de inversión. En los casos en que se requieran pH bajos, resulta conveniente para reducir la posibilidad de contaminación y por lo tanto la reducción en los gastos de esterilización.

### A2.3.4 Tipos de inhibición.

Las formas de inhibición más importantes son la competitiva y no competitiva: la competitiva presenta un aumento en la constante de Monod, manteniendo constante la velocidad específica de crecimiento máxima. Mientras que la inhibición no competitiva presenta cambios en la velocidad máxima de crecimiento manteniendo estable la constante de Monod. [61] Ambos tipos de inhibiciones se muestran en la fig. A2.8. Como es notorio el principal riesgo que presenta la inhibición no competitiva es que el crecimiento se ve desacelerado por presentar una velocidad de crecimiento máxima menor.

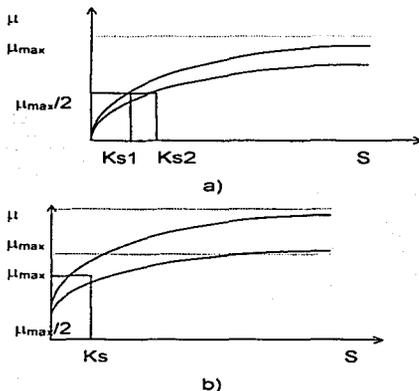


Fig. A2.8 a) inhibición competitiva, b) Inhibición no competitiva. [61]

#### A2.3.4.1 Efecto de la concentración alta de sustrato o de producto.

Altas concentraciones de sustrato, pueden resultar inhibitorias, para el crecimiento celular y la formación de producto (represión por catabolito). A altas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

concentraciones de sustrato, los microorganismos pueden sufrir una deshidratación osmótica, como ocurre a altas concentraciones de glucosa.

El crecimiento de poblaciones microbianas también puede ir acompañado por la formación de producto finales tóxicos que causan inhibición del crecimiento (represión por metabolito).

#### **A2.4 Cinética de formación de producto.**

La velocidad de formación de producto, independientemente de la clase de producto formado en un cultivo celular, puede expresarse en función de la concentración de biomasa. [21]

$$Q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (A2.30)$$

Donde  $Q_p$  es la velocidad específica de formación de producto.

La cinética de formación de producto, a partir de células, puede ser clasificada en dos grupos:

- iii) *Síntesis de producto asociado al crecimiento.* Esta clasificación corresponde principalmente a productos que son resultado del metabolismo energético (relacionado con las rutas de formación de ATP), así como proteínas intra y extracelulares. El crecimiento es generalmente la función celular que más energía requiere, por lo que sí la formación de producto está asociada al metabolismo energético (incluyendo funciones de mantenimiento con formación de ATP) el producto se formará siempre que exista crecimiento.

La velocidad de formación de producto puede expresarse de la siguiente forma:

$$Q_P = \alpha \mu \quad (\text{A2.31})$$

Donde  $\alpha$  es una constante de velocidad de reacción. [48]

Si se consideran las funciones de mantenimiento para el caso de formación de productos de bajo peso molecular.

$$Q_P = Y_{PX}\mu + m_P \quad (\text{A2.32})$$

Donde:

$Y_{PX}$  = rendimiento de formación de producto a partir de biomasa.

$m_P$  = velocidad específica de formación de producto debida al mantenimiento.

- b) *Síntesis de producto no asociado al crecimiento.* En esta modalidad es difícil relacionar la formación de producto con el crecimiento, ya que no existe relación entre ambos. Generalmente en este tipo de cinética la formación de producto ocurre posteriormente al crecimiento celular y se puede representar de la siguiente forma:

$$Q_P = \beta \quad (\text{A2.33})$$

Donde  $\beta$  es una constante de velocidad de reacción.

- c) *Modelo mezclado de crecimiento asociado y no asociado al crecimiento.* En algunos casos los datos experimentales se presentan mejor por un modelo combinado de crecimiento asociado y no asociado con el crecimiento, de la siguiente forma:

$$Q_P = \alpha \mu + \beta \quad (\text{A2.34})$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En las diferentes modalidades de formación de producto, el valor de la velocidad específica de formación de producto puede ser una función compleja de la velocidad de crecimiento, por lo cual siempre es preferible expresarse mediante ecuaciones empíricas obtenidas a partir de datos experimentales. [48]

### A2.5 Cinética de consumo de sustrato.

La velocidad de consumo de sustrato global puede expresarse en función a la concentración de biomasa de la siguiente forma:

$$Q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (\text{A2.35})$$

Donde  $Q_s$  es la velocidad específica de consumo de sustrato (g/lt).

El uso de sustrato por células dentro de un cultivo es canalizado a diferentes vías las cuales son: crecimiento, formación de producto y funciones de mantenimiento. La velocidad específica de consumo de sustrato para actividades de mantenimiento se conoce como coeficiente de mantenimiento  $m_s$  (g sustrato/g biomasa).

La cinética de consumo de sustrato presenta dos modalidades:

a) Consumo de sustrato en ausencia de formación de producto.

En ausencia de formación de producto se supone que todo el sustrato que entra a la célula se utiliza para el crecimiento y funciones de mantenimiento. La velocidad de consumo de sustrato se representa de la siguiente forma:

$$Q_s = \left[ \frac{\mu_{\max} S}{Y_{XS} (K_s + S)} + m_s \right] \quad (\text{A2.36})$$

La ecuación (A2.36) es válida siempre que exista sustrato disponible.

b) Consumo de sustrato con formación de producto.

Existen diferentes relaciones entre el consumo de sustrato y la formación de producto. Estas interrelaciones se muestran en la tabla A2.1, de acuerdo con la clasificación de Gaden.

Tabla A2.1 Tipos de procesos de fermentación de acuerdo con Gaden.

Tipo	Relaciones específicas de velocidad	Ejemplo
I	Formación de producto directamente asociado con la utilización de carbohidrato.	Etanol
II	Formación de producto indirectamente relacionado con la utilización de carbohidrato.	Acido cítrico
III	Formación de producto aparentemente no relacionado con la utilización de carbohidrato.	Penicilina

Quintero 1982

En fermentaciones del tipo I se debe identificar si existe formación de producto asociado al crecimiento o no asociado al crecimiento. En el caso de presentarse un crecimiento asociado al crecimiento, la ecuación que representa el consumo de sustrato es la misma ecuación (A2.36), ya que el sustrato se consume en las actividades metabólicas de crecimiento y mantenimiento celular.

Si por el contrario se presenta un consumo de sustrato no asociado al crecimiento como ocurre en el tipo de fermentación III, hay que considerar un término cinético más que involucre el consumo de sustrato. La velocidad específica de consumo de sustrato será:

$$Q_s = \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{Q_p}{Y_{PS}} + m_s \quad (A2.37)$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

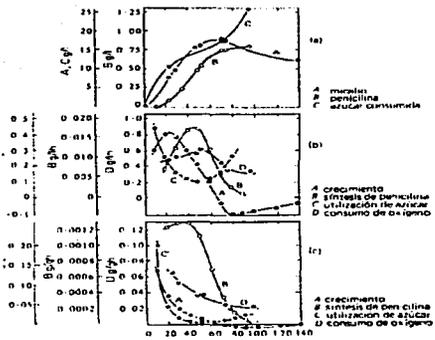
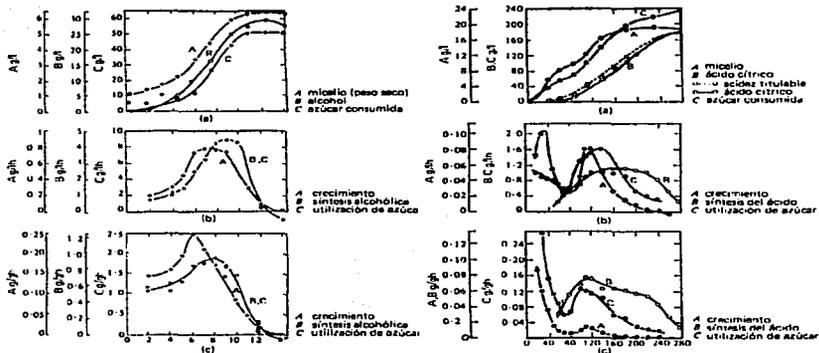


Fig. A2.9 Tipos de fermentaciones. I, II y III. a) Curvas tiempo concentración, b) tasas volumétricas, c) tasas específicas. [48]

## ANEXO 3: RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN Y PRODUCTIVIDAD.

### A3.1 Rendimientos de producción.

Generalmente el término rendimiento, se refiere a la cantidad de producto formado o acumulado, por cantidad de reactante suministrado o consumido. Los rendimientos de importancia se expresan mediante coeficientes de rendimiento, los cuales permiten cuantificar la necesidad de nutrientes y las características de producción de un microorganismo. La definición de los coeficientes de rendimiento pueden generalizarse de la siguiente forma [21]:

$$Y_{FG} = - \frac{\Delta F}{\Delta G} \quad (\text{A3.1})$$

Donde:  $Y_{FG}$  = coeficiente de rendimiento.  
 $F$  y  $G$  = sustancias involucradas en el metabolismo.  
 $\Delta F$  = masa de moles de  $F$  producidos.  
 $\Delta G$  = masa de moles de  $G$  consumidos.

Los coeficientes de rendimiento, son usados además para relacionar otras variables como unidades de calor, y no necesariamente cantidad de producto y reactante. Los coeficientes más utilizados, se resumen en la tabla A3.1.

Tabla A3.1 Principales coeficientes de rendimiento metabólico.

Símbolo	Definición.
$Y_{XS}$	Masa o moles de biomasa producida por unidad de masa o mol de sustrato consumido.
$Y_{PS}$	Masa o moles de producto formado por unidad de masa o mol de sustrato consumido.
$Y_{PX}$	Masa o moles de producto formado por unidad de masa o mol de biomasa formada.

Tabla A3.1 Continuación.

$Y_{XO}$	Masa o moles de biomasa formada por unidad de masa o mol de oxígeno consumido.
$Y_{CS}$	Masa o moles de dióxido de carbono formado por unidad de masa o mol de sustrato consumido.
RQ	Moles de dióxido de carbono formado por mol de oxígeno consumido. Este rendimiento, es el denominado coeficiente respiratorio.
$Y_{ATP}$	Masa o moles de biomasa formada por mol de ATP formado.
$Y_{kcal}$	Masa o moles de biomasa formada por kilocaloría de calor involucrada en la reacción.

Doran 1995

Los valores de  $\Delta F$  y  $\Delta G$  dependen del periodo de tiempo en el que se miden, por lo cual es necesario reportar los rendimientos en el tiempo o los periodos en el cual fueron obtenidos.  $\Delta F$  y  $\Delta G$  en un cultivo discontinuo pueden calcularse como la diferencia entre los valores inicial y final, obteniéndose un rendimiento global que representa una especie de valor medio durante todo el proceso.

Existen dos maneras de catalogar los rendimientos entre *teóricos* y *observados*. En el primero se espera obtener un rendimiento ya establecido sobre reacciones bien conocidas. En los rendimientos observados, se presentan desviaciones de la formación de producto ya sean positivas o negativas, respecto a un rendimiento teórico, por la presencia de reacciones simultáneas.

Los rendimientos teóricos se refieren normalmente a rendimientos máximos posibles, ya que estos representan el rendimiento en ausencia de reacciones paralelas. Aunado a esto, los rendimientos teóricos como  $Y_{XS}$ ,  $Y_{PS}$  y  $Y_{XP}$  son a menudo difíciles de calcular. Aunque estos rendimientos teóricos, son esencialmente coeficientes estequiométricos, la estequiometría de la formación de biomasa y de formación de producto se conoce únicamente para fermentaciones relativamente sencillas. Si las rutas metabólicas son complejas, los cálculos

estequiométricos llegan a ser demasiado complicados. Sin embargo, los rendimientos teóricos pueden relacionarse con los rendimientos observados los cuales se determinan de manera más sencilla. [21]

Los coeficientes de rendimiento pueden derivarse de la ecuación (A3.1), donde:

$$Y'_{XS} = -\frac{dX}{dS} = \frac{\mu}{Q_S} \quad (\text{A3.2})$$

$$Y'_{XP} = -\frac{dP}{dX} = \frac{Q_P}{\mu} \quad (\text{A3.3})$$

$$Y'_{PS} = -\frac{dP}{dS} = \frac{Q_P}{Q_S} \quad (\text{A3.4})$$

Donde: X, S y P = masa de células, sustrato y producto respectivamente.  
 $\mu$ ,  $Q_P$  y  $Q_S$  = velocidades observadas, evaluadas a partir de datos experimentales.

Con ayuda de las ecuaciones (A3.2), (A3.3) y (A3.4), se puede calcular los coeficientes representando X, S y P frente a cada uno de los otros y evaluando la pendiente en cada caso, como se muestra en la figura A3.1

Las formas de expresar  $\mu$ ,  $Q_S$  y  $Q_P$  se han resumido en el capítulo 5 y el apéndice 2; en las cuales  $Y_{XS}$ ,  $Y_{PS}$  y  $Y_{XP}$  se encuentran de forma implícita. Asociando estas ecuaciones con la (A3.2), (A3.3) y (A3.4), se pueden conocer los rendimientos teóricos.

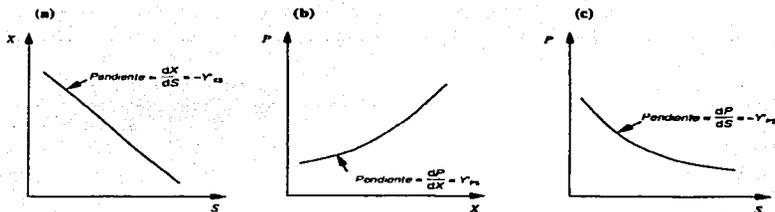


Fig. A3.1 Cálculo de los rendimientos observados en cultivo batch a partir de las concentraciones de células, sustrato y producto. [21]

### A3.2 Productividad

a) *Productividad en cultivo batch.*

La productividad (P) de una fermentación, es definida como [14]:

$$P = \frac{\text{Concentración de producto}}{\text{Tiempo de fermentación}} \quad (\text{A3.5})$$

Varios factores deben considerarse para la evaluación de los costos de un proceso, tal es el caso del tiempo de producción de la fermentación, el tiempo requerido para limpiar y preparar el biorreactor, el tiempo de esterilización y la duración de la fase de adaptación de la sepa productora. Ya sea que el proceso fermentativo termine a un tiempo de productividad máxima o mucho después, depende de los costos de operación como gastos en energía, gastos laborales y la capacidad del sistema.

La productividad máxima de biomasa en un proceso discontinuo está determinada por la siguiente ecuación:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$P = \frac{X_{\max} - X_0}{t_b} \quad (\text{A3.6})$$

$$P = \frac{X_{\max} - X_0}{\frac{1}{\mu_{\max}} \ln \frac{X_{\max}}{X_0} + t_1 + t_p} \quad (\text{A3.7})$$

- Donde:
- $X_{\max}$  = concentración de biomasa máxima producida.
  - $X_0$  = concentración de biomasa inicial.
  - $t_b$  = tiempo total de reacción en cultivo batch.
  - $\mu_{\max}$  = velocidad específica de crecimiento máxima.
  - $t_1$  = tiempo de adaptación o lag.
  - $t_p$  = tiempo necesario para limpiar, esterilizar y preparar el biorreactor.

b) *Productividad en cultivo continuo.*

En cultivos continuos, la productividad de biomasa, puede expresarse de la siguiente manera:

$$P = DX \text{ [=] gr/l}^*h \quad (\text{A3.8})$$

Sustituyendo  $X = Y_{XS} \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \right)$  en la ecuación (9.8) se tiene entonces:

$$P = DY_{XS} \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (\text{A3.9})$$

- Donde:
- $X$  = concentración de células.
  - $D$  = velocidad de dilución.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## ANEXO 4: ESTERILIZACIÓN.

La destrucción de microorganismos puede ser descrita como una ecuación de primer orden:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (\text{A4.1})$$

Donde:  $N$  = número de organismos viables  
 $t$  = tiempo de esterilización.  
 $k$  = velocidad específica de muerte celular.

La forma integrada de la ecuación (A4.1) es entonces:

$$\ln \frac{N_t}{N_o} = -kt \quad (\text{A4.2})$$

Donde:  $N_t$  = factor de riesgo o probabilidad de que un microorganismo de soporte un tratamiento térmico.  
 $N_o$  = cantidad inicial de microorganismos presentes en el medio de cultivo.

El valor de  $k$  depende de la especie bacteriana y de la temperatura de esterilización. La ecuación de Arrhenius muestra la relación de  $k$  respecto a la temperatura.

$$k = A e^{-E/RT} \quad (\text{A4.3})$$

Combinando la ecuación (A4.3) y (A4.2) se tiene que:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N_t} = Ate^{-E/RT} \quad (\text{A4.4})$$

$\nabla$  es un factor de diseño para esterilización, es cual también es llamado factor Del. Un factor de riesgo aceptable posterior a un tratamiento térmico es de  $1 \times 10^{-3}$ . [41] Un factor de seguridad adoptado para el diseño de procesos de esterilización, es la adopción de la velocidad de destrucción de esporas de *Bacillus Stearothermophilus* dentro de los cálculos (tabla A4.1) donde:

$$E = 67.7 \text{ Kcal mol}^{-1} \quad A = 1 \times 10^{36.2} \text{ seg.}$$

Tabla A4.1

T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	$\nabla$
100	0.019	-
101	0.025	0.044
102	0.032	0.076
103	0.040	0.116
104	0.051	0.168
105	0.065	0.233
106	0.083	0.316
107	0.105	0.420
108	0.133	0.553
109	0.166	0.720
110	0.212	0.932
111	0.267	1.199
112	0.336	1.535
113	0.423	1.957
114	0.531	2.488
115	0.666	3.154
116	0.835	3.989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla A4.1 Continuación.

117	1.045	5.034
118	1.307	6.341
119	1.633	7.973
120	2.037	10.010
121	2.538	12.549
122	3.160	15.708
123	3.929	19.638
124	4.881	24.518
125	6.056	30.574
126	7.506	38.080
127	9.293	47.373
128	11.494	58.867
129	14.200	73.067
130	17.524	90.591

Harvey W., Douglas S 1996

Sin embargo las condiciones que generan la destrucción de esporas de *Bacillus Stearothermophilus* podría afectar las propiedades nutricionales del caldo de cultivo por reacciones de deterioro como:

- a) Reacciones de oscurecimiento.
- b) Degradación de sustancias sensibles al calor como vitaminas y aminoácidos.

La destrucción térmica de un componente esencial del medio de cultivo se rige apropiadamente con una reacción de primer orden, por lo cual se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{x_i}{x_o} = e^{-kt}$$

(A4.5)

Donde:  $x_i$  = cantidad de nutriente después del tratamiento térmico.  
 $x_0$  = cantidad de nutriente inicial.  
 $k_n$  = constante de velocidad de destrucción del nutriente.

$k_n$  en la ecuación (A4.5) depende de la temperatura, por lo cual puede representarse apropiadamente por la ecuación de Arrhenius. La energía de activación para la destrucción térmica de nutrientes se encuentra en el intervalo de 10-30 Kcal mol<sup>-1</sup> [21]

El empleo de altas temperaturas y cortos tiempos refleja una disminución en la pérdida de nutrientes. La técnica ideal es calentar el medio de fermentación a una temperatura de esterilización, manteniéndola por un tiempo corto y finalmente enfriarlo hasta la temperatura de fermentación.

#### **A4.1 Esterilización batch.**

Ya que la esterilización discontinua es menos eficaz para evitar la destrucción de nutrientes comparado con la esterilización continua, el objetivo de la esterilización discontinua es obtener un nivel de esterilidad aceptado con la mínima pérdida de nutrientes. La temperatura recomendable para la esterilización discontinua es de 121 °C, diseñando el proceso adecuadamente para que esta temperatura permanezca el menor tiempo posible. Para tal efecto es necesario analizar la contribución de la reducción de la carga microbiana tanto en el periodo de calentamiento como en el de enfriamiento. La fig. A4.1 muestra el comportamiento de la temperatura en función del tiempo para esterilización discontinua.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

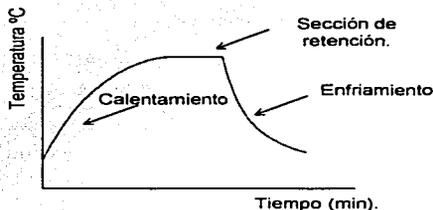


Fig. A4.1 Perfil de temperatura – tiempo para el ciclo de esterilización discontinua. [9]

Se debe de disponer de la siguiente información para el diseño de esterilización discontinua.

- El numero inicial de microorganismos presentes en el medio de cultivo.
- Las características de muerte térmica de los microorganismos, o asumir que todos los microorganismos son *Bacillus Stearothermophilus*.
- El riesgo de contaminación aceptable.
- El perfil de temperaturas en el calentamiento y enfriamiento.

El factor Del para una esterilización discontinua se expresa como [55]:

$$\nabla_{\text{total}} = \nabla_{\text{calentamiento}} + \nabla_{\text{retención}} + \nabla_{\text{enfriamiento}} \quad (\text{A4.5})$$

Una vez conocido el valor del factor Del total, el de calentamiento y enfriamiento, se puede calcular el tiempo de retención a temperatura constante mediante la ecuación (A4.4) Para resolver la ecuación (A4.5), se tiene que:

$$\nabla_{\text{calentamiento}} = \int_0^{t_1} A e^{-E/RT} dt \quad (\text{A4.6})$$

$$\nabla_{\text{enfriamiento}} = \int_{t_1}^{t_2} A e^{-ERT} dt \quad (\text{A4.7})$$

$$\nabla_{\text{retención}} = \int_{t_1}^{t_2} A e^{ERT} dt \quad (\text{A4.7})$$

Para resolver las ecuaciones A4.6 y A4.7 es necesario conocer los perfiles de tiempo – temperatura, ya que estos varían a lo largo de los periodos de calentamiento y enfriamiento. El régimen de tiempo – temperatura depende del tipo de equipo usado para la transferencia de calor. La tabla A4.2 presenta algunos ejemplos de equipo usado y su régimen de temperatura tiempo en cultivo batch.

Tabla A4.2

Método de transmisión de calor.	Perfil de Temperatura - tiempo	Constantes
Calentamiento		
Inyección directa de vapor	$T = T_o \left( 1 + \left\{ \frac{\alpha t}{1 + \delta t} \right\} \right)$	$\alpha = \frac{hS}{MC_p T_o} \quad \delta = \frac{S}{M}$
Vapor en intercambiadores de calor de serpiente o de tanque con camisa térmica	$T = T_{sa} (1 + \beta e^{-t})$	$\alpha = \frac{UA}{MC_p} \quad \beta = \frac{T_o - T_H}{T_H}$
Calentamiento eléctrico	$T = T_o (1 + \alpha t)$	$\alpha = \frac{q}{MC_p T_o}$
Enfriamiento		
Agua en intercambiadores de calor de serpiente.	$T = T_{\infty} (1 + \beta e^{-t})$	$\alpha = \left( \frac{WC_p}{MC_p} \right) \left( 1 + e^{-\frac{UA}{WC_p}} \right)$ $\beta = \frac{T_o - T_{\infty}}{T_{\infty}}$

Donde :

T = temperatura (°K)  
T<sub>o</sub> = temperatura inicial del medio (°K)  
t = tiempo (min.)  
h = entalpia del vapor (Kcal/kg.)  
S = flujo másico del vapor (Kg./min.)  
M = masa del medio (Kg.)  
C<sub>p</sub> = capacidad calorífica del medio (Kcal/Kg. °C)  
C<sub>p</sub>' = capacidad calorífica del medio de enfriamiento (Kcal/Kg. °C)  
W = flujo másico del medio de enfriamiento (Kg./min)

U = coeficiente global de transferencia de calor  
A = área de transferencia de calor (m<sup>2</sup>)  
T<sub>H</sub> = temperatura del medio de calentamiento (°K)  
q = velocidad de transferencia de calor (Kcal/Kg. °C)  
T<sub>∞</sub> = temperatura del medio de enfriamiento (°K)

---

Harvey W., Douglas S. (1996)

La esterilización del medio de cultivo se realiza, ya sea en el interior del biorreactor o en un recipiente independiente. La elección del sistema depende de la escala de operación y las características del medio. Por lo común la esterilización se realiza en el interior del biorreactor.

Las ventajas de esterilización discontinua en recipientes independientes son:

- a) Reducción del tiempo de preparación del biorreactor.
- b) Uso de equipos pequeños para esterilización de medios de cultivo concentrados.
- c) Evita el riesgo de corrosión del biorreactor por la esterilización de algunos medios de cultivo.

Las desventajas de la esterilización discontinua en recipientes independientes son:

- a) Elevados costos de construcción del tanque de esterilización, comparado con el del biorreactor.
- b) Requiere de equipo estéril de transporte del medio de cultivo al biorreactor que evite su contaminación.

#### **A4.2 Esterilización continua.**

La esterilización continua del medio de cultivo, al igual que la esterilización discontinua, consta de un periodo de calentamiento hasta una temperatura de esterilización, un periodo de retención a temperatura constante de esterilización y un periodo de enfriamiento hasta una temperatura de fermentación.

La esterilización continua se realiza principalmente por dos métodos:

- a) Inyección directa de vapor. El vapor es inyectado por medio de una válvula al interior de una tubería que contiene el medio de cultivo en flujo turbulento, alcanzando la temperatura de esterilización. Después del periodo de retención a temperatura constante, el medio es enfriado instantáneamente haciéndolo pasar a través de una válvula de expansión a una cámara de vacío, como se muestra en la fig. A4.2.
- b) Uso de intercambiadores de calor. El medio de fermentación es calentado por medio de intercambiadores de calor en espiral o de placas con elevados coeficientes de transferencia de calor. El medio es mantenido a temperatura constante de esterilización y enfriada en intercambiadores de calor hasta la temperatura de fermentación como se muestra en la figura 9.3.

En la esterilización continua el uso de elevadas temperaturas y cortos tiempos, puede disminuir considerablemente el daño térmico a los nutrientes, al mismo tiempo que se alcanzan niveles aceptables de destrucción de contaminantes. Para

fin de diseño, en la esterilización con inyección de vapor, la disminución de la carga microbiana en el periodo de calentamiento y enfriamiento se consideran insignificantes por su corto tiempo de duración.

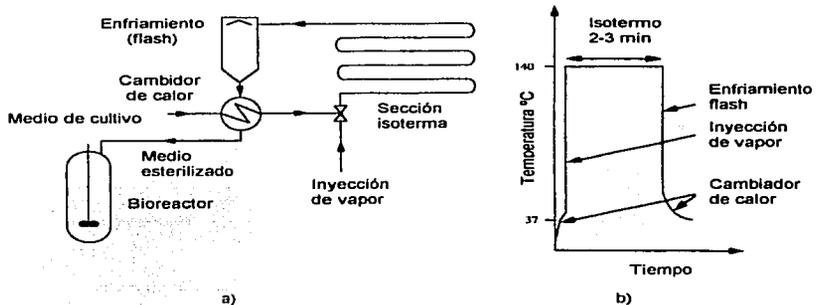


Fig. A4.2 Esterilización continua por inyección directa de vapor. a) Diagrama simplificado. b) Perfil temperatura – tiempo. [55]

Las ventajas de la esterilización con inyección de vapor sobre el uso de intercambiadores de calor, son las siguientes:

- a) Bajos costo de capital.
- b) Útil para medios de cultivo con sólidos suspendidos.
- c) Son de fácil limpieza y mantenimiento.
- d) Elevados aprovechamiento de vapor.
- e) Puede ser usado para medios de cultivo con sólidos suspendidos.

Desventajas de la esterilización con inyección de vapor sobre intercambiadores de calor

- a) Riego de formación de espuma durante los periodos de calentamiento y enfriamiento.
- b) Requiere de vapor limpio y libre de agentes corrosivos.

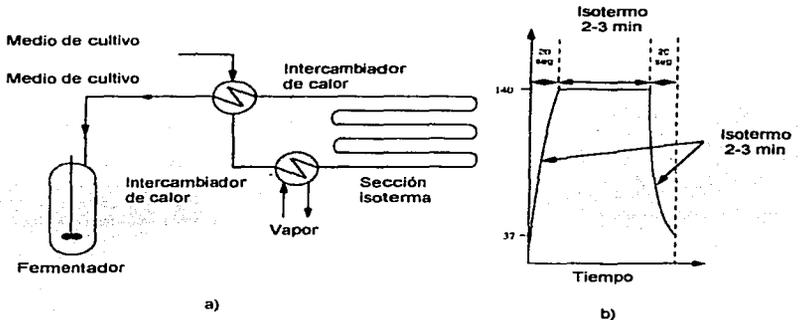


Fig. A4.3 Esterilización continua por intercambiadores de calor  
 a) Diagrama simplificado. b) Perfil temperatura – tiempo. [60]

#### A4.3 Ventajas y desventajas entre esterilización continua y batch.

*Ventajas de esterilización continua sobre esterilización batch.*

- a) Mayor calidad nutricional del medio de cultivo.
- b) Fácil escalamiento.
- c) Control automático sencillo.
- d) Reducción en el gasto de vapor. Reducción en un 20-245%.
- e) Reducción del riesgo de corrosión en el biorreactor.

*Ventajas de esterilización batch sobre esterilización continua.*

- a) Empleo de bajos costos de capital
- b) Bajos riesgos de contaminación (esterilización continua requiere de transferencia aséptica del caldo estéril al biorreactor).
- c) Control manual sencillo.
- d) Util para medios de cultivo con materiales sólidos en altas concentraciones.

Resumiendo, la elección del sistema de esterilización depende de:

- a) Del modo de operación.
- b) Del grado aceptable de destrucción del medio.
- c) De los costos de inversión.

**A4.4 Dispositivos de transferencia de calor en el bioreactor.**

Los dispositivos de transferencia de calor en biorreactores, tienen dos funciones:

1. Refrigerar o calentar el medio de cultivo, según el tipo de reacción a efectuar (endotérmica o exotérmica), con el fin de mantener su temperatura constante y óptima para el crecimiento celular.
2. La esterilización del medio de cultivo, si esta se hace en el interior del biorreactor.

Los dispositivos de transferencia de calor se resumen en la fig. A4.4. La cantidad de calor generado durante la fermentación, define el tipo de configuración o configuraciones a usar para eliminar el exceso del mismo. Normalmente para reactores de pequeña escala basta con una camisa externa.

Las condiciones del agua de enfriamiento se definen directamente de las condiciones ambientales a las que pueda estar sujeto el aire que recircule a través de la torre de enfriamiento, por lo cual el flujo volumétrico de agua de enfriamiento que debe ser suministrado a la camisa del bioreactor, se determinará de la operación más crítica del proceso fermentativo: el enfriamiento del medio de cultivo.

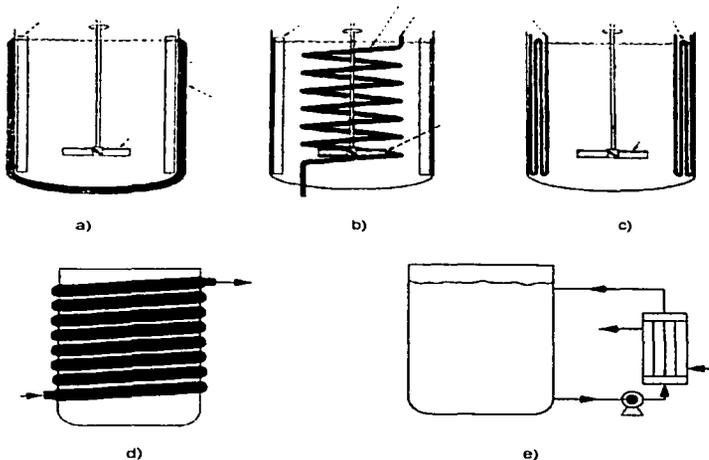


Fig. A4.4 Configuraciones de transmisión de calor para biorreactores. a) camisa externa, b) serpentín interno, c) deflectores, d) serpentín externo y e) cambiador de calor externo. [21]

#### A4.4.1 Ecuaciones para calentamiento y enfriamiento batch de recipientes encamisados y agitados.

El tiempo de calentamiento o enfriamiento del medio de cultivo en tanques agitados de doble camisa de una temperatura  $t_1$  a  $t_2$  es [22]:

Para calentamiento:

$$\theta = \left( \frac{mC_p}{UA} \right) \ln \left( \frac{T - t_1}{T - t_2} \right) \quad (A4.1)$$

Para enfriamiento:

$$\theta = \left( \frac{mC_p}{UA} \right) \ln \left( \frac{t_1 - T}{t_2 - T} \right) \quad (A5.2)$$

Donde:  $T$  = temperatura del medio de enfriamiento.  
 $m$  = masa del medio de cultivo.  
 $C_p$  = capacidad calorífica del medio de cultivo.

El coeficiente de global de transferencia de calor ( $U$ ) puede calcularse mediante:

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_i} + \frac{x}{k} + \frac{1}{h_o} \quad (A4.3)$$

Donde:  $h_i$  = coeficiente de transferencia de calor en el interior del bioreactor.  
 $h_o$  = coeficiente de transferencia de calor en el interior de la camisa calefactora.  
 $x$  = espesor de la pared que separa el medio de cultivo del medio de enfriamiento.  
 $k$  = conductividad calorífica del material de construcción.

Para el cálculo de  $h$ , y  $h_j$ , consúltese la referencia 25, donde se presentan correlaciones aplicadas a tanques agitados de doble camisa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO 5: INSTRUMENTACIÓN Y CONTROL.

### A5.1 Termómetros de resistencia.

Estos se basan en el principio de que la resistencia de los metales, incrementa con la temperatura. Estos son construidos en forma de alambres largos y enrollados para disminuir su tamaño. Cuando la corriente pasa a través del rollo, un cambio de voltaje se produce y este a su vez, se relaciona con la temperatura. El termómetro tiene tiempos de respuesta cercanos a 1 seg. Si el conductor se encuentra aislado, el tiempo de respuesta incrementa a los 5-10 seg.

Los termómetros de resistencia industriales se construyen siempre de platino, cobre o níquel. Estos poseen un intervalo amplio de resistencia (que va de los  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  –  $650\text{ }^{\circ}\text{C}$  para un termómetro de platino). La relación de la temperatura y la resistencia del termómetro, no es lineal en todo el intervalo de temperatura, pero puede ser considerado constante en el límite requerido para fermentaciones (fig. A5.1).

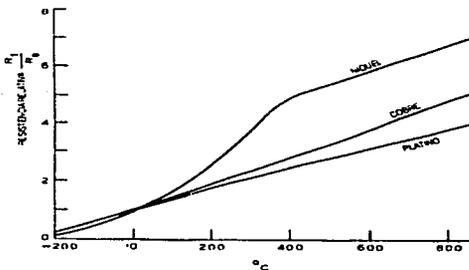


Fig. A5.1 Curvas usuales de termómetros de resistencia para el alambre de platino, cobre y níquel, en donde a la temperatura  $t$  y  $R_0$  = resistencia a  $0^{\circ}\text{C}$ . [Perry 1992]

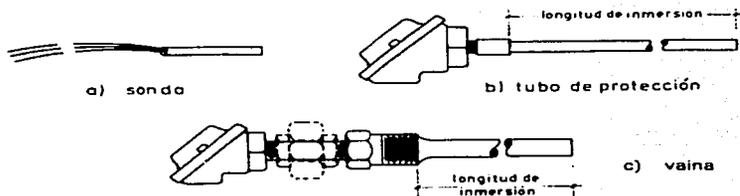


Fig. A5.2 Tipos de termómetros de resistencia [13]

Tabla A5.1 Características de termómetros de resistencia.

Metal	Resistivida d $\mu\Omega/\text{cm}$	Coefficient e temp. $\Omega/\Omega, ^\circ\text{C}$	Intervalo útil de temp. $^\circ\text{C}$	$\varnothing$ min. de hilo mm	Coste relativo	Resis. sonda a $0^\circ\text{C}$ , ohmios	Precis ón $^\circ\text{C}$
Platin	9.83	0.0035	-200-950	0.5	Alto	25,100, 130	0.01
Níquel	6.38	0.0063- 0.0066	-150-300	»	Medio	100	0.50
Cobre	1.56	0.00425	-200-120	»	Bajo	10	0.10

Atkinson 1995

#### A5.1.1 Termistores (semiconductores).

Los termistores son semiconductores los cuales exhiben un incremento en su conductividad con la temperatura. Poseen tiempos de respuesta en el orden de 1 segundo, cuando el contacto térmico es bueno. Si el semiconductor se aísla, el tiempo de respuesta puede aumentar a 10 segundos. Tanto los termoresistores como los termómetros de resistencia son relativamente baratos. De la misma forma que los termómetros de resistencia, los termoresistores, no guardan una

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

relación lineal entre la resistencia y la temperatura; pero si se adecuan a los pequeños cambios de temperatura que exhiben las fermentaciones, esta relación, puede considerarse lineal. Los termistores se fabrican con óxidos de níquel, manganeso, hierro, cobalto, cobre, magnesio y titanio.

### A5.2 Medicion de pH.

Los instrumentos de pH pueden ser esterilizables con vapor de agua, dentro del reactor, con la desventaja de que la continua esterilización puede afectar el funcionamiento del instrumento, siendo necesario realizar calibraciones constantes al electrodo.

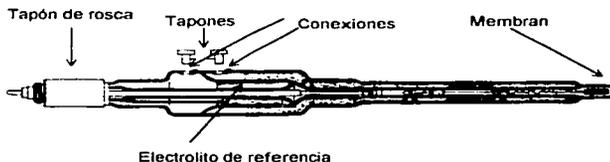


Fig. A5.3 Electrodo de pH. [5]

Tabla A5.3 Sensores de pH esterilizables con vapor. [5]

Fabricante	Estilo	Modelo	Intervalo de temperatura (°C)	Intervalo de Presión
Activion	Combinado	11-801	10-140	-
Glass, Ltd.		11-902	10-140	
Ingold	Combinado	761/764	-10-130	6 bar
Leeds & Northup	Combinado	117494	20-130	3.5 bar
		117495		

### A5.3 Medición del oxígeno disuelto.

Ambos tipos de sondas ofrecen tiempos de respuesta en el orden de los 90 segundos, lo cual hace dudar que sean suficientemente rápidos para la medición del  $k_L a$ . En este tipo de sondas la reproducibilidad se consigue raramente, particularmente se esteriliza al vapor, por lo cual es esencial una calibración continúa.

Realmente las sondas OD no miden la concentración de oxígeno disuelto, sino la actividad o la presión parcial del oxígeno. Por esta razón las sondas OD son frecuentemente calibradas para leer el porcentaje de saturación utilizando aire y nitrógeno libre de oxígeno como los puntos de 0-100% de calibración. Es posible sin embargo relacionar la presión parcial del oxígeno, con la concentración de oxígeno disuelto utilizando la ley de Henry, ya que la solubilidad del oxígeno en los caldos de fermentación es muy baja.

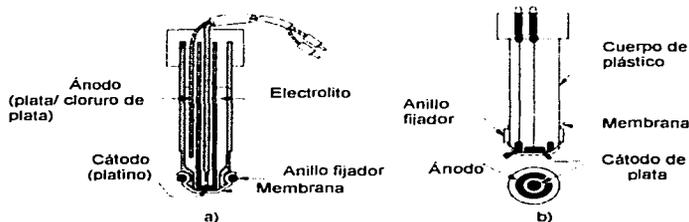


Fig. A5.4 Diferentes tipos de sensores de oxígeno disuelto. a) polarigráfico b) galvánico. [5]

Tabla A5.4 Algunas sondas comerciales de OD. [5]. <sup>a</sup> Esterilizable con vapor (121 °C como mínimo. <sup>b</sup> 90 % de lectura a 20°C.

Fabricante	Tipo de sensor	Intervalo de Medición de OD (ppm)	Tiempo de respuesta (s) <sup>b</sup>
Beakman Instruments Instrumentation Laboratory, Inc. <sup>a</sup>	Polarigráfico	0-9.99	30
	Polarigráfico	0-20	20
New Brunswick Scientific Co. , Inc. <sup>a</sup>	Galvánico	0-8	45
Transidine General Corp.	Polarigráfico	0-1999	-
Yellow Springs Instruments. <sup>a</sup>	Galvánico	0-8	60-120

#### A5.4 Nivel de espuma.

La formación de espuma presenta un problema serio en las fermentaciones ya que se fomenta la contaminación mermando el rendimiento u obstaculizando filtros. Comúnmente muchos medios de cultivo fomentan la formación de espuma, principalmente en los cultivos aeróbios, por la producción de agentes espumantes como proteínas, polisacáridos y ácidos grasos. El esquema completo se resume en la figura A5.5

Existe un conjunto de antiespumantes en el mercado que incluyen aceites naturales, n-parafinas y alcoholes superiores (alcoholes monohídricos y polihídricos; alcohol octílico, alcoholes G-12 a G-20, alcohol laurico). Algunos antiespumantes son metabolizados por los microorganismos, por lo cual pueden ser considerados como una fuente adicional de fuente de carbono.

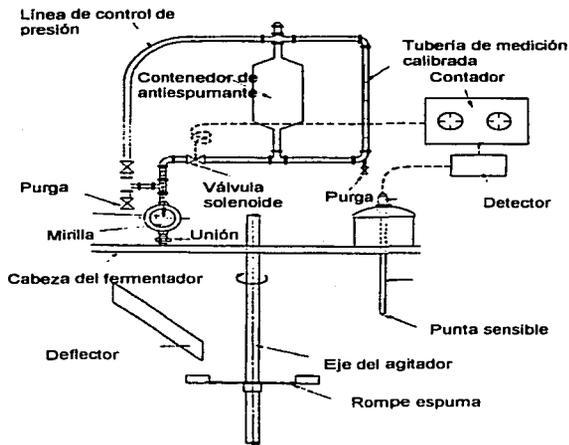


Fig. A5.5. Equipo para el control de espuma en los caldos de fermentación. (Control combinado por métodos químicos y mecánicos). [1]

## A5.5 Flujo de aire.

### A5.5.1 Rotámetros

En los rotámetros (Fig. A5.7) la velocidad de flujo se determina por medio de un flotador que se mueve libremente en el interior de un tubo graduado, creciente y montado verticalmente. Estos instrumentos generalmente no requieren de un cálculo previo; el tipo de rotámetro se selecciona consultando catálogos del fabricante de acuerdo a las características del fluido manejado. [23]

#### ***A5.5.2 Medidores térmicos del flujo de masa.***

Los medidores de flujo de aire másico, determinan el flujo de gas, detectando las diferencias de temperatura a lo largo de un dispositivo calefactor colocado en el paso del gas (fig. A5.6). El principio de este medidor de flujo radica en que el calor transferido es directamente proporcional a la cantidad de flujo másico.

#### **A5.6 Medidores de nivel.**

En los indicadores de nivel de vidrio se instala en forma de que el líquido se comuniquen con el indicador de vidrio paralelo al reactor. En los medidores de presión diferencial, una celda de presión diferencial se puede usar como transmisor de nivel, ya que el nivel de líquido se refleja como una presión equivalente a la altura del líquido asociado con la densidad de este. Si se tiene un recipiente a presión, (como suceden la esterilización del caldo de cultivo en el interior del reactor) el arreglo del transmisor respecto al reactor se conecta como se muestra en la figura A5.8.

Otra forma de conocer el nivel de líquido, es por medio de un sensor del nivel del líquido, que mide la capacidad del condensador formado por un electrodo sumergido en el líquido y en las paredes del tanque. La capacitancia registrada, depende linealmente del nivel del líquido. El dispositivo de medida está montado tal y como se muestra en la figura (A5.9)

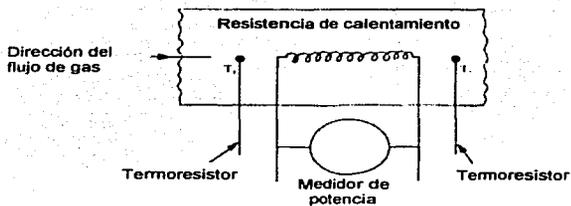


Fig. A5.6 Medidor de flujo térmico. [5]

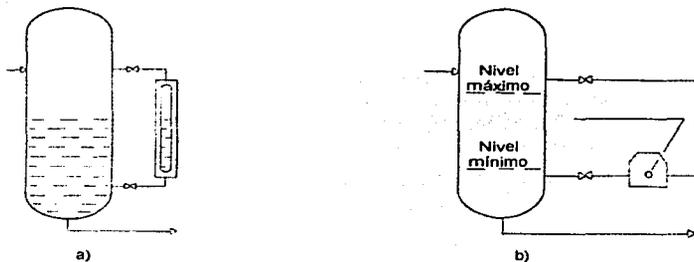


Fig. A5.8 Indicadores de nivel: a) indicador de nivel, b) indicador de presión diferencial. [23]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

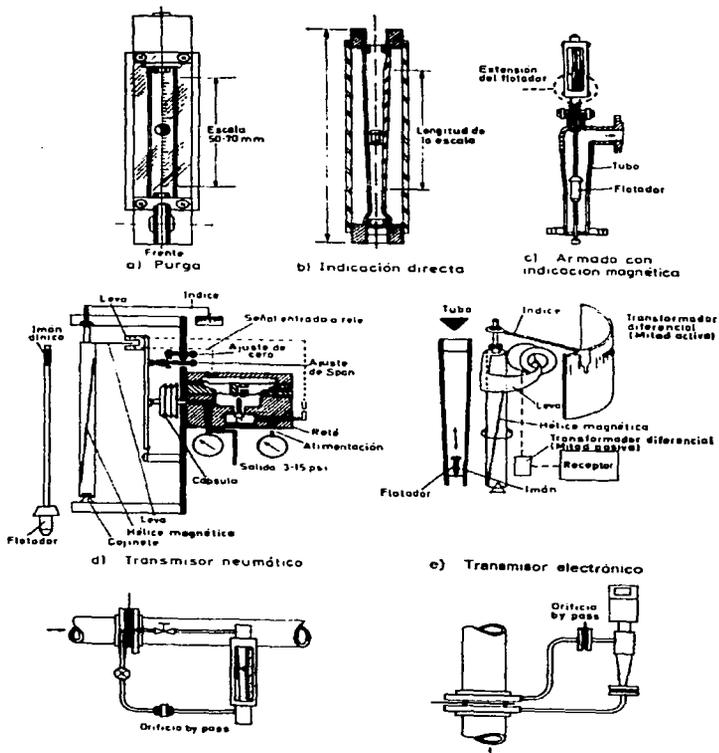


Fig. A5.7 Tipos de rotámetros. [15]

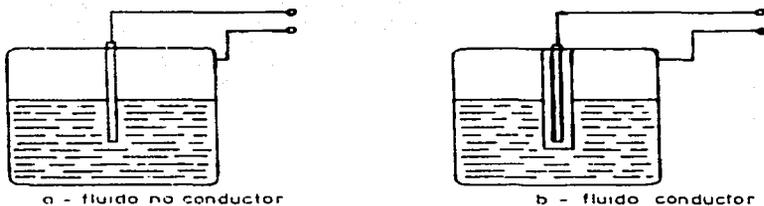


Fig. A5.9 Medidores de capacidad. a) fluidos conductores, b) en fluidos conductores. [13]

#### A5.7 Análisis del gas de salida.

Las moléculas paramagnéticas tales como el oxígeno presentan electrones no apareados los cuales giran inestables alrededor del núcleo. Cuando un flujo magnético es aplicado, los átomos tienden a orientarse en la dirección del campo.

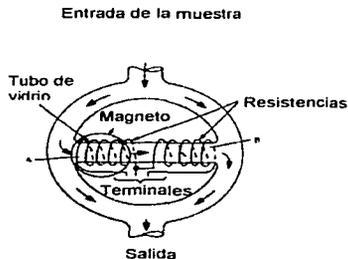


Fig. A5.10 Analizador termomagnético. [5]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

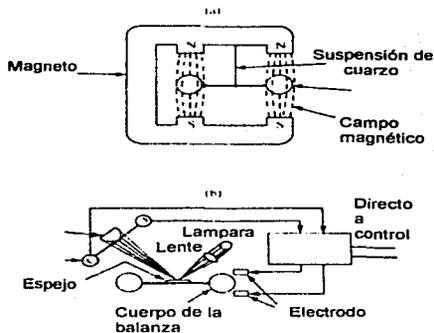


Fig. A5.11 Analizador pagnetodinámico:  
a) vista superior, b) vista lateral. [5]

Tabla A5.5 Analizadores de oxígeno.

Fabricante	Modelo	Intervalo de medición (% de O <sub>2</sub> )	Tiempo de respuesta (s)	Precisión (% EC)	Intervalo de temperatura de la muestra (°F)	Método de medición.
Beckman Instruments	755	0-1 a 0-100	7	± 2	-20-120	Paramagnético
Mine Safety Appliances	802	0-0.5 a 0-100	80	± 2	32-118	Paramagnético
Taylor Instruments	OA 184	0-25 a 0-100	7	± 1	14-122	Paramagnético

Atkinson 1995

Tabla A5.6 Analizadores de bióxido de carbono.

Fabricante	Modelo	Intervalo de medición (% de CO <sub>2</sub> )	Tiempo de respuesta (s)	Precisión
Anarad, Inc. Cavitron Corp.	AR500	0-30	5	± 1%
Beckman Instruments	865	0-5	0.5	± 1% EC
Infrared Instruments	IR703 IR702	0-1 0-30	5	± 1% C
Mine Safety (M.S.A.)	200	0-30	5	± 1%

Atkinson 1995. \*ES precisión de escala completa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **ANEXO 6: SERVICIOS AUXILIARES.**

La producción de  $\alpha$  amilasa dentro del bioreactor, requiere de servicios auxiliares dentro de los cuales son de uso indispensable:

1. Agua de proceso.
2. Agua de enfriamiento.
3. Vapor de calentamiento.
4. Aire estéril comprimido.
5. Energía eléctrica.

### **A6.1 Agua de proceso.**

#### *A6.1.1 Características.*

Las características del agua de proceso y su pretratamiento, dependen de la composición del agua disponible. Las operaciones de pretratamiento de agua, deben ser capaces de controlar todos o algunos de los siguientes contaminantes o características:

- Materiales suspendidos (orgánicos e inorgánicos).
- Coloides.
- Cargas iónicas.
- Metales.
- Bacterias.
- Temperatura.
- pH.
- Pirógenos.
- Gases disueltos.

Las etapas típicas en las operaciones de pretratamiento de agua son por lo general [5]:

- a) *Filtración*: la filtración puede ser usada para asegurar la calidad del agua por la eliminación de materiales debajo de los niveles de micras.
- b) *Tratamiento con carbono activado*: con esto se asegura la eliminación de olores, sabores, cloro y materia orgánica total.
- c) *Tratamiento de intercambio iónico*: el tratamiento iónico, principalmente busca la eliminación de aminas terciarias como requisito típico, mediante resinas iónicas.
- d) *Ósmosis inversa*: dependiendo de la permeabilidad de los materiales con que se efectúa la ósmosis inversa, esta puede reducir la carga iónica y materiales orgánicos totales.
- e) *Ultrafiltración*: la ultrafiltración es capaz de eliminar bacterias y materia orgánica, por lo que su uso se restringe a procesos donde se requiere agua de gran pureza.

#### *A6.1.2 Transporte.*

Tanto las válvulas como las tuberías, deben ser de acero inoxidable 316L. Las válvulas de diafragma son las más recomendadas para evitar contaminación exterior, con la desventaja de que requieren de un mayor mantenimiento. [19]

### **A6.2 Agua de enfriamiento.**

#### *A6.2.1 Características.*

El agua de enfriamiento, no requiere de una gran calidad, ya que se mantiene aislada del medio de fermentación. Sin embargo la composición del agua de enfriamiento debe ser compatible con los materiales de construcción de los intercambiadores de calor, a fin de evitar corrosiones e incrustaciones. El pretratamiento de las aguas de enfriamiento, para

sistemas de recirculación (torres de enfriamiento), puede realizarse de diferentes formas, ya sea por la adición de cromatos, cal, zeolita o por la deaeración del agua de recirculación.

#### **A6.2.2 Transporte.**

El agua de enfriamiento suele conducirse a través de tuberías de acero al carbón. Por razones de higiene y apariencia, las tuberías en el área de proceso, pueden ser de acero inoxidable. [19]

### **A6.3 Vapor de calentamiento.**

#### **A6.3.1 Características.**

El agua usada para la producción de vapor debe ser tratada con agentes reductores de dureza, con el fin de evitar incrustaciones en el equipo mismo de producción de vapor, en el interior de las tuberías de proceso y en la camisa de calentamiento del bioreactor. La esterilización de las tuberías en los arreglos del transporte del inoculo, adición de antiespumante y el puerto de vaciado, exigen de vapor con calidades similares a las del agua de proceso, ya que se trata de evitar el mínimo riesgo de contaminación.

#### **A6.3.2 Transporte.**

Para servicios de calentamiento, basta con tuberías de acero al carbón para llevar el vapor hasta el punto de uso. [19]

#### **A6.4 Aire estéril comprimido.**

##### *A6.4.1 Características.*

El aire comprimido debe estar libre de microorganismos patógenos que pudieran afectar la producción de  $\alpha$  amilasa. La forma de acondicionar el aire para fermentación es ampliamente discutido en el apartado de esterilización.

##### *A6.4.2 Transporte*

El transporte del aire antes de pasar por los filtros esterilizables con vapor puede ser dentro de tuberías de acero al carbón. El transporte después de los filtros de esterilización, deberá de ser en tuberías de acero inoxidable 316L con acabado sanitario, para facilitar su limpieza y evitar problemas de contaminación. [5]

#### **A6.5 Energía eléctrica.**

##### *A6.5.1 Características.*

Los equipos que mayor cantidad de corriente eléctrica exigen, son tanto el motor del agitador como el compresor de aire, por lo cual deberá considerarse el nivel de corriente que asegure el funcionamiento de estos.

# ANEXO 7: TABLAS RELACIONADAS A ESPECIFICACIONES DEL CÓDIGO ASME.

<b>PROPIEDADES DE LOS MATERIALES - ACERO INOXIDABLE</b>													
<b>P-No. 8 Grupo No. 1</b>													
<b>COMPOSICION NOMINAL, 16 Cr - 8 Ni</b>	<b>TABLA 1</b>												
	Producto	No. de Espec.	Grado	Notas									
	Placa	SA-240	304	2 3									
	Tubo	SA-213	TP304	2 3									
<b>Cedencia min. 30 000 lb/pulg<sup>2</sup> Tension min. 75 000 lb/pulg<sup>2</sup></b>	Tubo	SA-213	TP304H	1									
	Tubo	SA-312	TP304	2									
	Tubo	SA-312	TP304H	1									
	Tubo	SA-376	TP304	2									
	Tubo	SA-376	TP304H	1									
	Tubo soldado	SA-452	TP304H	1									
	Faja	SA-182	F304	1 2									
	Faja	SA-182	F304H	1									
	Barra	SA-479	304	2 3 5									
	<b>TABLA 2</b>												
Producto	No. de Espec.	Grado	Notas										
Placa	SA-240	304L	1										
Tubo	SA-213	TP304L	1										
Tubo	SA-312	TP304L	1										
Faja	SA-182	F304L	1										
Barra	SA-479	304L	5										
<b>COMPOSICION NOMINAL, 16 Cr - 12 Ni - 2Mo.</b>	<b>TABLA 3</b>												
	Producto	No. de Espec.	Grado	Notas									
	Placa	SA-240	316	2 3									
	Placa	SA-240	317	2 3									
<b>Cedencia min. 30 000 lb/pulg<sup>2</sup> Tension min. 75 000 lb/pulg<sup>2</sup></b>	Tubo	SA-213	TP316	1									
	Tubo	SA-213	TP316H	1									
	Tubo	SA-312	TP316H	1									
	Tubo	SA-312	317	1									
	Tubo	SA-376	TP316H	1									
	Tubo	SA-376	TP316H	1									
	Tubo soldado	SA-452	TP316H	1									
	Faja	SA-182	F316	1									
	Faja	SA-182	F316H	1									
	Barra	SA-479	316	2 3 5									
<b>TABLA 4</b>													
Producto	No. de Espec.	Grado	Notas										
Placa	SA-240	316L	1										
Tubo	SA-213	TP316L	1										
Tubo	SA-312	TP316L	1										
Faja	SA-182	F316L	4										
Barra	SA-479	316L	5										
<b>VALORES MAXIMOS DE ESFUERZO PERMITIDO, 1 000 lb/pulg<sup>2</sup></b>													
<b>PARA TEMPERATURAS DEL METAL NO MAYORES DE 680DS F</b>													
<b>MATERIALES DE 1/4" A 1 1/2" (TABLA 1)</b>	20-100	200	300	300	500	600	650	700	750	800	850	900	NOTAS
	<b>1</b>	19.8	17.8	16.6	16.2	15.9	15.9	15.9	15.8	15.8	15.7	14.9	14.7
<b>2</b>	18.8	15.7	14.1	12.9	12.1	11.4	11.2	11.1	10.8	10.6	10.4	10.2	1
	15.7	14.7	14.3	14.7	14.4	14.0	13.7	12.5	13.3	13.0	—	—	1
<b>3</b>	15.7	13.4	12.0	11.0	10.3	9.7	9.5	9.4	9.2	9.1	—	—	1
	18.8	18.8	18.4	18.1	18.0	17.0	16.7	16.3	16.1	15.9	12.7	12.5	1
<b>4</b>	18.8	16.2	14.6	13.4	12.4	11.8	11.6	11.3	11.0	10.9	10.9	10.9	1
	15.7	14.7	14.3	14.7	14.4	13.5	13.2	12.6	12.6	12.4	12.1	—	1
<b>MATERIALES DE 1/2" A 1 1/2" (TABLA 2)</b>	150	175	190	195	200	200	200	200	200	200	200	200	NOTAS
	<b>1</b>	14.4	13.5	12.2	9.5	7.7	6.1	4.7	3.7	2.9	2.3	1.8	1.4
<b>3</b>	10.0	9.8	9.5	9.5	7.7	6.1	4.7	3.7	2.9	2.3	1.8	1.4	1
	15.4	15.3	14.2	12.4	9.8	7.4	5.8	4.1	3.1	2.3	1.7	1.3	1
	10.7	10.6	10.2	10.3	9.3	7.4	5.5	4.1	3.1	2.3	1.7	1.2	1
<b>NOTAS:</b>													
1. Estos valores de esfuerzo no exceden de 2.3 por ciento del 90% de la resistencia a la cedencia a la temperatura de uso de estos materiales. Para las temperaturas de 680DS y superiores, los valores de esfuerzo permisionados no se excederán estos valores de esfuerzo por 1/3 del nivel de las propiedades de fluencia aplicables y las que se aplican en forma normalizada para cada uno de los tipos de materiales.													
2. La temperatura superior a 1875 DS es el punto de fusión de estos materiales. Los valores de esfuerzo permisionados se aplican a una temperatura máxima de 1875 DS, excluyendo el momento en que el metal está fundiendo.													
3. Para temperaturas superiores a 680DS, estos valores de esfuerzo permisionados aplican al material en estado de tensionamiento. Se aplican a una temperatura máxima de 1875 DS, excluyendo el momento en que el metal está fundiendo.													
4. El esfuerzo mínimo especificado a temperatura de 680DS y superior.													
5. El punto de fusión de estos materiales para el grado de barras se indica en las tablas de propiedades de los materiales.													

## PRESION DE LOS FLUIDOS CARGA ESTATICA

El fluido contenido en el recipiente ejerce presión sobre las paredes del mismo. Cuando el fluido está en reposo, la intensidad de la presión en un punto es igual en todas direcciones hacia los lados y el fondo del recipiente y varía según la altura del fluido respecto al punto en el que se esté considerando la presión.

Cuando sea aplicable, la carga estática deberá sumarse a la presión de diseño del recipiente.

Las tablas de esta página indican las relaciones entre la presión y la altura del agua.

Para determinar la presión de cualquier otro fluido que no sea agua, los valores de las tablas deberán multiplicarse por la densidad específica del fluido en cuestión.

### Presión en libras por pulgada cuadrada para diferentes cargas de agua

Carga, en pies	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		0.43	0.87	1.30	1.73	2.16	2.60	3.03	3.46	3.90
10	4.33	4.76	5.20	5.63	6.06	6.49	6.93	7.36	7.79	8.23
20	8.66	9.09	9.53	9.96	10.39	10.82	11.26	11.69	12.12	12.56
30	12.99	13.42	13.86	14.29	14.72	15.15	15.59	16.02	16.45	16.89
40	17.32	17.75	18.19	18.62	19.05	19.48	19.92	20.35	20.78	21.22
50	21.65	22.08	22.52	22.95	23.38	23.81	24.25	24.68	25.11	25.55
60	25.98	26.41	26.85	27.28	27.71	28.14	28.58	29.01	29.44	29.88
70	30.31	30.74	31.18	31.61	32.04	32.47	32.91	33.34	33.77	34.21
80	34.64	35.07	35.51	35.94	36.37	36.80	37.24	37.67	38.10	38.54
90	38.97	39.40	39.84	40.27	40.70	41.13	41.57	42.00	42.43	42.87

NOTA: Un pie de agua a 62° Fahrenheit produce una presión de 0.433 libras por pulgada cuadrada. Para hallar la presión por pulgada cuadrada para cualquier carga en pies no considerada en la tabla superior, multiplique la carga en pies por 0.433.

### Cargas de agua en pies que corresponden a una presión dada en libras por pulgada cuadrada

Presión, lb./pulg. <sup>2</sup>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		2.3	4.6	6.9	9.2	11.5	13.9	16.2	18.5	20.8
10	23.1	25.4	27.7	30.0	32.3	34.6	36.9	39.3	41.6	43.9
20	46.2	48.5	50.8	53.1	55.4	57.7	60.0	62.4	64.7	67.0
30	69.3	71.6	73.9	76.2	78.5	80.8	83.1	85.4	87.8	90.1
40	92.4	94.7	97.0	99.3	101.6	103.9	106.2	108.5	110.8	113.2
50	115.5	117.8	120.1	122.4	124.7	127.0	129.3	131.6	133.9	136.3
60	138.6	140.9	143.2	145.5	147.8	150.1	152.4	154.7	157.0	159.3
70	161.7	164.0	166.3	168.6	170.9	173.2	175.5	177.8	180.1	182.4
80	184.8	187.1	189.4	191.7	194.0	196.3	198.6	200.9	203.2	205.5
90	207.9	210.2	212.5	214.8	217.1	219.4	221.7	224.0	226.3	228.6

NOTA: Una presión de una libra por pulgada cuadrada equivale a 2.309 pies de agua a 62°F. Por lo tanto, para hallar la carga en pies de agua para cualquier presión que no aparezca en la tabla, multiplique por 2.309 la presión en libras por pulgada cuadrada.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## TIPOS DE JUNTAS SOLDADAS

TIPOS NORMA UW-12		EFICIENCIA DE LA JUNTA, E Cuando la junta es:		
		a. Radiogra- fiada total- mente	b. Examinada por zonas	c. No Examinada
1	 <p>Jointa a tope hechas por doble cordón de soldadura o por otro medio con el que se obtenga la misma calidad de metal de soldadura depositada sobre las superficies interior y exterior de la pieza. Si se emplea placa de respaldo, debe quitarse ésta después de terminar la soldadura.</p>	1.00	0.85	0.70
2	 <p>En juntas circunferenciales únicamente.</p> <p>Junta a tope de un solo cordón con tira de respaldo que queda en su lugar después de soldar</p>	0.90	0.80	0.65
3	 <p>Junta a tope de un solo cordón sin tira de respaldo</p>	-	-	0.60
4	 <p>Junta a traslape de doble filete completo</p>	-	-	0.55
5	 <p>Junta a traslape de un solo filete completo con soldaduras de tapón</p>	-	-	0.50
6	 <p>Junta a traslape de un solo filete completo sin soldaduras de tapón</p>	-	-	0.45

## **ANEXO 8: AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMAS**

### **A8.1 Aislamiento y purificación.**

La selección de los procedimientos de purificación enzimática depende de su localización. Por otro lado, las enzimas extracelulares están generalmente libres dentro del medio con solo otros pocos componentes, como sucede con  $\alpha$  amilasa. Las enzimas son proteínas y su alto grado de especificidad como la catálisis es manifestada solo en su estado nativo. La conformación nativa es conservada bajo condiciones específicas de pH, temperatura y fuerza iónica, por lo tanto solo suaves y métodos específicos pueden ser usados para el aislamiento enzimático. [25] La extracción, se refiere a la liberación de los productos intracelulares, mediante la destrucción de las células.

#### *A8.1.1 Separación sólido – líquido.*

El primer paso para el aislamiento de las enzimas extracelulares, es la separación de las células y sólidos del medio de líquido de fermentación. La separación se puede realizar por filtración, centrifugación o floculación.

##### *a) Filtración.*

La velocidad de filtración esta en función del área de filtrado, presión, viscosidad y resistencia ocasionada por la torta de filtrado y el medio. Durante la filtración de suspensiones, el incremento en el grosor de la torta de filtrado y la simultánea resistencia, gradualmente disminuye la velocidad de flujo. Además las dificultades pueden aumentar por la compresibilidad del material biológico. En este caso la resistencia ocasionada por la torta de filtrado, la velocidad de filtrado depende de la presión aplicada. Si la presión aplicada excede ciertos límites, la torta puede colapsar y bloquear totalmente el filtro.

Los filtros de presión son usados para filtrar pequeños volúmenes o para remover precipitados durante la purificación. La capacidad para retener materia sólida es limitada. Sin embargo, estos filtros son altamente recomendables para la filtración fina de soluciones enzimáticas. Los filtros rotatorios al vacío, son recomendables para aquellos materiales biológicos fácilmente compresibles. Estos filtros son usados para la filtración continúa de grandes volúmenes. La suspensión a ser filtrada, es normalmente mezclada con ayuda filtro antes de ser enviada al filtro. El uso de filtros rotatorios para organismos pequeños puede dar elevadas tasas de separación en el rango de 200-1000 l/m<sup>2</sup>h. El uso de ayuda filtro genera dos desventajas: a) representa un contaminante en la purificación, b) puede generar pérdidas de producto por absorción en el ayuda filtro.

La filtración por membranas, microfiltración o ultrafiltración, pueden rendir hasta el 100% de la separación de la biomasa, siempre y cuando el producto pase a través de la membrana.

#### *b) Centrifugación.*

En el campo de la centrifugación, el rango de aplicación depende del tamaño de partícula y del contenido de sólidos (tabla 6.1).

Tabla A8.1 Utilización de diferentes centrifugas.

Tipo de centrifuga	Contenido de sólidos %	Tamaño de partícula, µm
Separador multifacético	0-5	0.5-500
Separador de discos	3-10	0.5-500
Separador de chorro	5-25	0.5-500
Decantado	5-40	5-50000
Centrifuga de tamiz	5-60	5-10000
Centrifuga de presión	20-75	100-50000

Bullock 1991

Las centrifugas de disco pueden ser usadas en la remoción continua de materia sólida en suspensiones. Los sólidos pueden ser descargados de forma continua o discontinua. Las bacterias pueden ser separadas por combinación de elevadas fuerzas centrífugas por arriba de las 15000 gravedades.

*c) Floculación.*

La floculación de células bacterianas para formar agregados de mayor tamaño es comúnmente usado para separar las células del caldo de cultivo. La floculación se realiza por la adición de sales o polímeros orgánicos. La neutralización de las cargas de las superficies celulares y la formación de puentes entre células individuales permiten la agregación. La separación por floculación suele ser más eficiente si se complementa con una centrifugación posterior que acelere la separación de los agregados celulares.

*A8.1.2 Concentración.*

La concentración, es el próximo paso, siguiendo la regla de remover el componente más abundante en primer instancia. El volumen del material a ser procesado es generalmente muy grande y cantidades sustanciales de material acuoso puede ser removido. Solo procedimientos suaves de concentración deben ser empleados para no inactivar las enzimas. La concentración puede efectuarse por medio de tratamientos térmicos, precipitación y filtración con membranas.

*a) Evaporación.*

Referente a los tratamientos térmicos, estos deben ser de tiempos cortos debido a la sensibilidad de las enzimas a las altas temperaturas. Dado a las características de termoestabilidad de la  $\alpha$  amilasa, este método podría ser útil para su concentración. Evaporadores de múltiple efecto suelen utilizarse para concentrar productos térmicamente estables, tales como ácido cítrico y aminoácidos. Los



tipos de evaporadores que pueden ser empleados para la concentración por evaporación son de película descendente o de tubo largo vertical.

*h) Precipitación.*

Las enzimas son proteínas complejas las cuales poseen tanto grupos ionizables como hidrófobos los cuales interactúan con el agua. La precipitación de las proteínas pueden ser agregadas y finalmente precipitadas por cambios en el ambiente. La precipitación se puede realizar por:

1. Precipitación con sales. Altas concentraciones de sales actúan sobre las moléculas que rodean la proteína, cambiando las fuerzas electrostáticas responsables de su solubilidad. Las sales de sulfato de amonio son las más usadas, solo que poseen la desventaja de ser corrosivas. El sulfato de sódico no es corrosivo, pero su menor solubilidad requiere que se eleve la temperatura por arriba de los 35 °C, para conseguir el mismo grado de precipitación fraccionada que ofrece el sulfato de amonio.
2. Precipitación con solventes orgánicos. La precipitación de las proteínas se realiza por cambios de la solubilidad de estas en la solución. Los solventes más usados son el etanol y la acetona. Solo son obtenidos buenos resultados si la concentración de solvente y la temperatura son cuidadosamente controlados, ya que las enzimas pueden ser fácilmente inactivadas por los solventes.
3. Precipitación al punto isoeléctrico. La solubilidad de las proteínas esta muy influenciada por el pH, y es mínima a el punto isoeléctrico en el cual la carga neta es cero. Usualmente esta técnica es usada a pequeña escala.

### **c) Ultrafiltración.**

El uso de una membrana semipermeable permite la separación de moléculas de solvente de las enzimas, debido a que las moléculas pequeñas pueden penetrar la membrana cuando la presión osmótica es excedida. Los flujos a través de las membranas se encuentran en el rango de 20-40 l/m<sup>2</sup>h<sup>2</sup>, por lo cual una operación de múltiple etapa puede ser necesaria para minimizar el área de membrana requerida. Las desventajas de usar membranas para concentrar, se presentan cuando moléculas de gran tamaño tienden a acumularse cerca de la superficie de la membrana obstruyendo el paso de moléculas a través de ella, en especial, cuando el agente antiespumante se deposita en la superficie de la membrana. Los materiales que han sido probados para ser utilizados como membranas son: acetato de celulosa, polímeros orgánicos tales como polipropileno. [25]

En la mayoría de las ocasiones el diseño final de un sistema biorreactor está en función de las demandas mercantiles de un producto en específico. El precio del producto depende principalmente de los costos de operación y la amortización del equipo. Ambos elementos juegan un papel importante en la optimización del proceso.

### **A8.2 Purificación.**

Normalmente las enzimas que están destinados para usos analíticos o médicos, requieren de una mayor pureza, la cual es posible por métodos como la cristalización, la electroforesis y cromatografía. [34] Sin embargo los usos comerciales de  $\alpha$  amilasa no requiere de elevados grados de pureza, por lo cual, solo es recomendable dar una purificación parcial, suficiente con la concentración.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **ANEXO 9: PRESENTACIÓN DE ALGUNOS COSTOS DE MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN.**

### **15.1 Clasificación de costos en la producción de enzimas.**

Dos son los requerimientos primordiales para la producción de cualquier enzima:

1. El producto debe satisfacer las exigencias de los consumidores en términos de propiedades y calidad.
2. Los costos de producción deben ser minimizados para lograr una mejor relación entre precios competitivos y ganancias.

Los costos de un proceso fermentativo pueden ser divididos en:

#### *Costos variables.*

- a) Costo de materiales crudos y químicos usados en la preparación del medio de cultivo.
- b) Costo en servicios tales como electricidad, vapor y agua.

#### *Costos semivariables.*

- a) Costos de operación y supervisión del proceso.
- b) Costos incluidos en la provisión y mantenimiento.
- c) Costos en servicios analíticos, control de la calidad microbiológica o tratamiento de efluentes.

#### *Costos fijos.*

- a) Depreciación.

- b) Amortizaciones.
- c) Cargo de intereses sobre el capital empleado.

### 15.2 Presentación de algunos costos de materiales de construcción.

La construcción del bioreactor y de la operación del mismo implica tanto los costos de los materiales de construcción, los costos de los instrumentos de medición, los costos de manufactura, los costos de instalación y los costos de certificación en el caso de que la construcción del bioreactor se apegue estrictamente a las disposiciones establecidas en el código de construcción ASME. A continuación se presentan un listado de los principales materiales, accesorios e instrumentos de medición necesarios para la construcción y funcionamiento del bioreactor para abril de 2001, con la finalidad de tangibilizar el presente proyecto.

Tabla A9.1 Área de acero inoxidable necesario para la construcción del bioreactor. Acero inoxidable 316L de 9.5 mm de espesor de 1.22x3.05 m.

Dimensión	Cabeza	Pestaña	Casco
Diámetro interior	0.751	0.751	0.751
Diámetro exterior	0.769	0.769	0.769
Área	0.59	0.092	4.83
Volumen	0.036	0.016	0.886
Altura	0.187	0.038	2.0
Diámetro	2.41	2.41	2.41

Tabla A9.2 Número de válvulas requeridas por arreglo de tuberías.

Arreglo	Globo	Check	Diafragma automática
Transporte de inóculo.	8	2	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla A9.2 Continuación.

Transporte de antiespumante y álcali.	7		2
Puerto de cosecha.	4		
Puerto de aire estéril.	7		
Circuito de calentamiento y enfriamiento.	7		
Total	33	2	2

Tabla A9.3 Lista de productos con sus respectivos precios.

Producto	Cantidad	Precio unitario US\$	Total	
			US \$	MN \$
Placa de acero inox. 316L de 9.5 mm de espesor, de 1.22x3.05m. Peso aprox. 604 por placa	5 placas 1455 kg	3.46/kg	5034.3	
Válvula manual de globo de acero inox. 316L de 1"	33	181.5	5989.5	23359.05
Válvula check de acero inox. de 1"	2	174.59	349.18	

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Tabla A9.3 Continuación.**

Válvula de diafragma automática de acero inoxidable 316L de 1"	2	524.2	1048.4	
Recipiente portafiltro de acero inox. para filtros de cartucho.	2	896.0	1792.0	
Filtros de cartucho de polipropileno de 0.45 $\mu\text{m}$ de poro. Caja con 6 piezas	1	410.28	410.28	
Filtros de cartucho de 10 $\mu\text{m}$ de poro. Caja con 15 piezas	1	350.1	350.1	
Rotámetro de vidrio de 1.5-7.4 GPM	1	316	316	
Termómetro digital con sonda de platino (RTD)	1	215	215	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla A9.3 Continuación.

Electrodo de pH	1	164.6	164.6	
Electrodo de oxígeno disuelto con cátodo de platino y ánodo de plata, en acero inox 316, esterilizable con vapor.	1	1138.5	1138.5	
Controlador proporcional integral derivado para oxígeno disuelto.	1	1754.35	1754.35	
Controlador proporcional integral derivado para pH (ácido, base)	1	1728.45	1728.45	
Controlador de temperatura para calentamiento y enfriamiento	1	1407.6	1407.6	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla A9.3 Continuación.**

Analizador de oxígeno de tipo paramagnético.	1	5295	5295	
Analizador de CO <sub>2</sub> de infrarrojos.	1	5195	5195	
Espectrómetro de infrarrojos versión estándar		76000		
<b>Total.</b>			<b>32188</b>	<b>299349</b>

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### **13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

1. Aiba S., Humphrey A. E., y Millis N. F. (1983). **Biochemical Engineering.** Academic Pres.
2. Asenjo J., Merchuck J. (1995). **Bioreactor system design.** Dekker inc.
3. **ASME Boiler and pressure vessel code an american national standard.** (1989) Section VIII, Rules of Construction of Pressure Vessels, Division 1. The American Society of Mechanical Engineers.
4. Atkinson B. (1986) **Reactores bioquímicos.** Reverte S.A.
5. Atkinson B., Mavituna F. ( 1991) **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook.** Macmillan, Basingstoke. 2ª edición.
6. Bartholomai alfred (1991) **Fabricas de alimentos.** Acribia, S.A.
7. Brennan J. C. (1980) **Las operaciones de la ingeniería de los alimentos.** Acribia.
8. Brook Thomas D. (1984) **Microbiología.** Prentice-Hall Hispanoamericana S. A. Cuarta Edición.
9. Bulock J., Kistainsen B. (1991). **Biotecnología basica.** Acribia.
10. Castellan Gilbert W. (1987). **Fisicoquímica.** Adisson wesley iberoamericana.
11. Castro Moreno María Isabel (1995) **Procedimiento ejemplificado para el diseño de un fermentador productor de biomasa bacteriana.** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM.
12. Considine Douglas M. (1974) **Process instruments and controls hanbook.** Mc. Graw Hill.
13. Creus Sole Antonio (1992) **Instrumentación industrial.** Alfromega, S.A de C.V.

14. Crueger Wult, Crueger Anneliese. (1982). **Biotechnology a textbook of industrial microbiology.** Academic associates, inc.
15. Chemineer. (1985) Liquid agitación. McGraw Hill, Inc.
16. Chemineer. GT Turbine agitators.
17. Chemineer. HT turbine agitators Bulletin 711.
18. Chemineer. Impellers. Bulletin 713.
19. De la Cruz Javier Ana María Sabina (1992) Diseño de distribución de areas y redes de tuberías para la propuesta de rehubicación de la planta piloto de la carrera de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM.
20. Dobreva E., Ivanova V. **Influence of the immobilization condition on the efficiency of  $\alpha$  amylase production by *Bacillus licheniformis*.** Process Biochemistry. 31 (1996) 229-234.
21. Doran P. M. (1995). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Academic press limited.
22. Dream Robert F. Heat transfer in agitated jacketed vessels. Chemical engineering. Junio de 1999.
23. Espíritu Santo Pedro (1982) Instrumentación y control de tanques agitados. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM.
24. Gacesa P., Hobbie J. (1990) Tecnología de las enzimas. Acribia, S.A.
25. Gerhartz Wolfgang (1990) Enzymes in industry. VCH Publishers.
26. Granados Pérez Raquel, Villanueva Peris M<sup>a</sup> del Carmen (1997) Microbiología.

27. Greene Richard W. (1992) **Compresores. Selección, uso y mantenimiento.** Mc Graw Hill.
28. Harvey W., Douglas S. (1996) **Biochemical Engineering.** Marcel Dekker.
29. Hicks W. Richard, Gates E. Lewis. (1976) **Aplicación guidelines for turbine agitators.** Chemical Engineering. Diciembre de 1976.
30. Hicks W. Richard, Gates E. Lewis. (1976) **How select turbine agitators for dispersing gas into liquids.** Chemical Engineering. Julio de 1976.
31. Hubard D.W., Ledger S.E and Hoffman J.A. **Scaling-up aerobic fermentation which produce non-newtonian, viscoelastic broths.** Biotechnology Advances in Bioprocess Engineering. 1994
32. Ivanova V., Emanuilova E. **HPLC study of starch hydrolysis products obtained with  $\alpha$  amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis*.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 30 (1991)
33. Kawase Y., Kumagai and Umeo S. **Desing and Scale-up of bioreactors for dence suspensión broths.** Recent Advances in Biotechnology Advances in Bioprocess Engineering. 1992.
34. Kennedy John F. Cabral Joaquín M.S. (1993) **Recovery Process For Biological Material.** Wiley Plubishers.
35. Kent N. L. (1987) **Tecnología de los cereales.** Editorial Acriba, S.A.
36. Kossen N.W.F. **Bioreactor Engineering.** Advances in Bioprocess Engineering (1994)
37. Kossen N.W.F. **Scale up.** Advances in Bioprocess Engineering (1994)
38. Levine Ira. (1987). **Fisicquímica.** Mc. graw hill.

39. Lyndersen K. Bjorn, Dielia A. Nancy. (1994) **Bioprocess engineering systems, equipment and facilities.** Jhon Wyley & Sons, Inc.
40. Medina Isabel Miguel (1999) **El comercio de los azúcares y jarabes en el TLCAN.** Universidad Autónoma Chapingo.
41. Megyesy Eugene F. (2000) **Manual de recipientes a presión. Diseño y cálculo.** Limusa, Noriega Editores.
42. Mittal G.S. (1992) **Food biotechnology.** Technomic Publishing co., inc.
43. Mondragon Millan Luis Antonio (1993) **Manual del P. T. de enzimas de uso alimentario.** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM.
44. Owen P. Ward (1989). **Fermentation Biotechnology.** Open university pres.
45. Pelcazar Michael J. (1981) **Elementos de microbiología.** Mc Graw-Hill.
46. Pérez Rubio Abigayl (1997) **Industrias productoras de jarabes de maíz en México.** Universidad Autónoma Chapingo.
47. Priest F. G., **Thirunavukkarasu M. Synthesis and localization of  $\alpha$  amilase and  $\alpha$  glucosidase in *Bacillus licheniformis* grown in batch and continuous culture.** Journal of applied bacteriology. 58 (1985) 381-390.
48. Quintero Rodolfo (1981) **Ingeniería Bioquímica. Teorías y aplicaciones.** Alhambra S.A.
49. Rehm H. (1987) **Biotechnology, vol 7a.** Ediciones VCH.
50. Rehm H. J., Reed G. (1993) **Biotechnology. Volumen 3 y 4.** VCH. Alemania.
51. Reyes Martín Edgar (1991) **Caracterización de una enzima degradadora de almidón (amilasa), obtenida a partir de una bacteria aislada del medio ambiente.** Universidad Autónoma Chapingo.

52. Scragg (1996). *Biotecnología para ingenieros*. Limusa.
53. Schenck Fred W., Hebeda Ronald E. (1990) *Starch Hydrolysis Products* (Worldwide Technology, Production and Applications). VCH Publishers.
54. Solomons G. L. (1969) *Materials and methods in fermentation*. Academic Press.
55. Stambury Peter F., Whitaker Allan. (1989) *Principles of fermentation technology*. Pergamon Press.
56. Tinoco Ignacio Jr., Kenneth Saver. (1978). *Fisicoquímica y aplicaciones en las ciencias biológicas*.
57. Tonkova Alexandra, Manolov Radosvet. **Termoestable  $\alpha$  amylase from derepressed *Bacillus Licheniformis* produced in high yields from glucose**. *Process Biochemistry* 1993, 28, 539-542.
58. Treibal Robert E. (1980) *Operaciones de transferencia de masa*. McGraw-Hill.
59. Weemaes C.. De Cordt S. **High pressure, thermal, and combined pressure-temperature stabilities of  $\alpha$  amilase from *Bacillus Species***. *Biothecnology and bioengineering*. 50 (1995) 49-56.
60. Wiseman Allan (1991) *Manual de biotecnología de las enzimas*. Acribia 2ª edición.
61. <http://www.cheminer.com>
62. <http://www.aceroinox.com.mx>