



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“ESTUDIO DE BIORREACTORES IDEALES”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTAN

**ALVARADO TIENDAS AURORA
GUTIÉRREZ CHINO DIEGO EDUARDO**

ASESORA

M. EN E. MARÍA TERESA YLIZALITURRI GÓMEZ PALACIO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de biorreactores ideales.

Que presenta la pasante: **Aurora Alvarado Tiendas**

Con número de cuenta: 306134881 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería Química

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Ricardo Paramont Hernández García	
VOCAL	M. en C. Gilberto Atilano Amaya Ventura	
SECRETARIO	M. en E. María Teresa Ylizaliturri Gómez Palacio	
1er. SUPLENTE	Q.I. Elizabeth Cruz Ruiz	
2do. SUPLENTE	I.Q.I. Raúl Gómez Gómez Tagle	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de biorreactores ideales.

Que presenta el pasante: **Diego Eduardo Gutiérrez Chino**
Con número de cuenta: **305287805** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería Química**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Ricardo Paramont Hernández García	
VOCAL	M. en C. Gilberto Atilano Amaya Ventura	
SECRETARIO	M. en E. María Teresa Ylizaliturri Gómez Palacio	
1er. SUPLENTE	Q.I. Elizabeth Cruz Ruiz	
2do. SUPLENTE	I.Q.I. Raúl Gómez Gómez Tagle	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos:

Queremos agradecer a nuestra tutora la M. en E. María Teresa Ylizaliturri Gómez Palacio por todo su apoyo, enseñanzas y amistad durante la elaboración de la presente tesis.

A nuestros sinodales por tomarse el tiempo de revisar este trabajo

Dr. Ricardo Paramont Hernández García

M. en C. Gilberto Atilano Amaya Ventura

Q.I. Elizabeth Cruz Ruiz

I.Q.I. Raúl Gómez Gómez Tagle

Agradecimientos Aurora Alvarado Tiendas:

A mis padres y amigos por darme su apoyo moral y económico.

Agradecimientos Diego Eduardo Gutiérrez Chino:

A mis padres, hermanos y amigos por su apoyo confianza y cariño que he recibido durante toda la carrera.

Índice

Objetivos.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	5
1. Biorreactor.....	7
1.1. Definición de biorreactor.....	8
1.2. Características de un biorreactor.....	8
2. Clasificación de los biorreactores.....	10
2.1. Clasificación por diseño.....	11
2.1.1. Biorreactores sin agitación ni aeración.....	11
2.1.2. Biorreactores sin agitación, con aeración.....	12
2.1.3. Biorreactores con agitación y aeración.....	12
2.2. Clasificación operativa.....	13
2.3. Clasificación biológica.....	14
2.3.1. Biorreactor anaerobio.....	14
2.3.2. Biorreactor aerobio.....	14
3. Biorreactores y tipos de cultivo.....	16
3.1. Células y microorganismos anaeróbicos.....	17
3.2. Células y microorganismos aeróbicos.....	17
3.3. Células y microorganismos facultativos.....	18
4. Biocatálisis.....	19
4.1. Biocatalizador.....	20
4.2. Clasificación de los biocatalizadores.....	21
5. Cinética y ecuación de Michaelis-Menten y Monod.....	25
5.1. Cinética.....	26
5.2. Ecuación de Michaelis-Menten.....	27
5.3. Consideraciones importantes sobre la cinética de Michaelis-Menten.....	31
5.4. Gráfico de Lineweaver-Burk.....	32
5.5. Ecuación de Monod.....	33
5.5.1. Estequiometría.....	35
5.5.2. Balances de masa.....	38
6. Análisis de los biorreactores tipo batch, CSTR, PFR para la producción de la Penicilina.....	41
6.1. Reactor tipo batch.....	42

6.2.	Reactor tipo CSTR.....	45
6.3.	Reactor tipo PFR.....	48
7.	Ventajas y desventajas de las biorreactores.....	51
7.1.	Ventajas.....	52
7.2.	Desventajas.....	52
8.	Aplicaciones de los biorreactores en la industria química.....	53
9.	Conclusiones.....	55
10.	Bibliografía.....	57

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Analizar el comportamiento dinámico de los diferentes biorreactores ideales para la producción de la penicilina, utilizando la enzima *Penicillium chrysogenum* como biocatalizador.

Objetivos Particulares:

- Explicar los antecedentes de los biorreactores ideales, analizando sus características y clasificación de acuerdo a sus componentes físicos y operativos.
- Explicar la clasificación de los biocatalizadores según su función tanto enzimática como microbiana.
- Explicar la ecuación de Michaelis-Menten para describir la cinética y mecanismos de una reacción enzimática.
- Explicar el modelo de Monod para cinética microbiana.
- Utilizar balances de materia infinitesimales para biorreactores batch y de flujo continuo con la finalidad de obtener las ecuaciones diferenciales ordinarias gobernantes que describan la evolución espacio-temporal de las diferentes especies químicas y biológicas que participan en la biotransformación.

INTRODUCCIÓN.

Desde tiempos muy antiguos el hombre se ha visto en la necesidad de producir alimentos, medicamentos y combustibles, entre otros productos de utilidad para el ser humano, los cuales eran elaborados de forma artesanal, presentándose frecuentemente dificultades para controlar ciertas variables durante los procesos de producción.

Debido a estos problemas surgen los biorreactores, los cuales contienen mezclas en su interior con características biológicas, que como tal un reactor convencional no cumpliría con los requerimientos para un estándar de calidad deseado. Debido a que los biorreactores farmacéuticos, alimenticios y energéticos, llevan un control más preciso de pH, temperatura, y presión. (Atkinson, 1986).

Los biorreactores son equipos fundamentales en los procesos bioquímicos, en los que se emplean sistemas microbianos fungales o plantas para la manufactura económica de una amplia variedad de productos biológicos útiles; mientras que el reactor convencional no cumpliría con los requerimientos necesarios, debido a que no se encuentra adaptado para proveer un medio controlado, el cual es necesario para alcanzar el crecimiento y la formación de los productos deseados.

Por ejemplo, en el caso de los biorreactores utilizados en la industria farmacéutica y alimenticia, es necesario que el control del pH y el control de la agitación del sistema sea más precisa, así como la temperatura y la presión, ya que si no se controlan estas variables, la eficiencia del proceso es menor, debido a que se deteriora la biomasa que se encuentra en el sistema.

Actualmente, se realizan estudios para hacer diseños más eficientes de los biorreactores para la producción de cada uno de los productos que son consumidos por el ser humano. Dependiendo del tipo de industria, el biorreactor a utilizar contará con ciertas características específicas para el proceso.

En la figura 1, se muestran algunos productos que se elaboran mediante la utilización de biorreactores, pertenecientes a los siguientes sectores de la vida diaria:

- Medicamentos (genéricos y no genéricos).

- Productos de belleza.
- Alimentos para humanos y animales.
- Artículos de limpieza.
- Materia prima para la industria textil.
- Suplementos nutricionales.

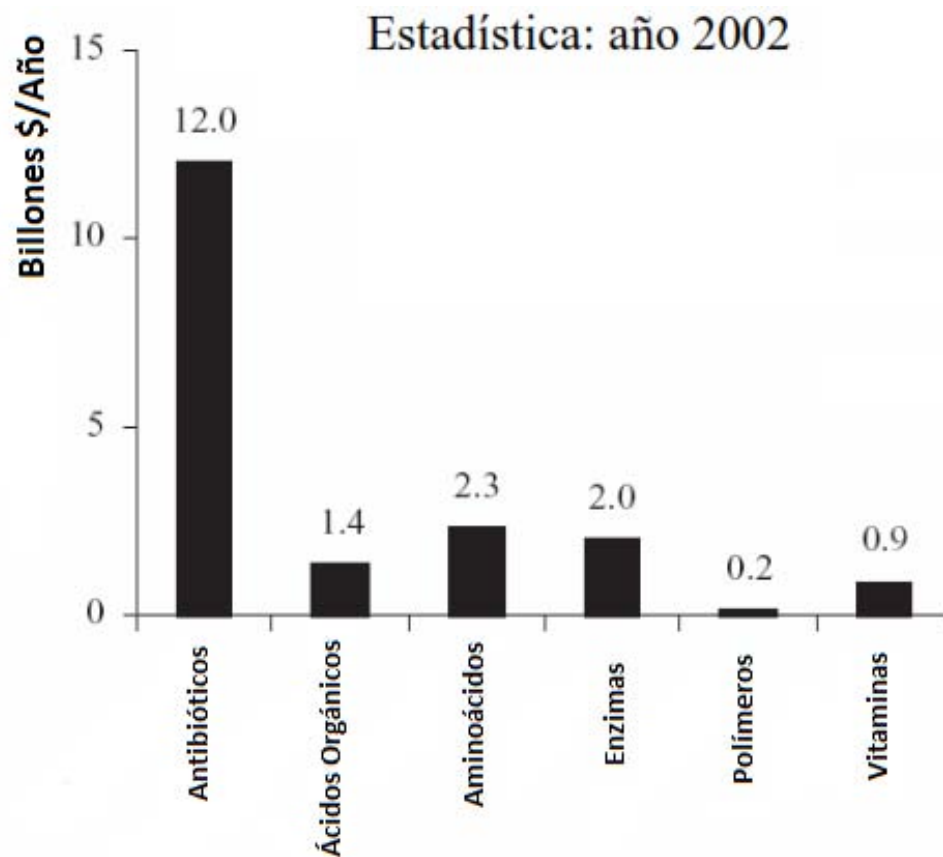


Figura 1. Mercado mundial de productos de la biotecnología industrial.

(Kent y Riegel, 2007)

Hay estudios que demuestran que los biorreactores tienen una gran eficiencia en diferentes tipos de productos a realizar; por dar algunos ejemplos: agua tratada, producción de bioetanol, producción de biogás; estos útiles para cada tipo de industria, beneficiando a la población en general y al medio ambiente, ya que de esta manera se aprovecha cada materia orgánica en general.

Entre las aplicaciones de los biorreactores, una de las más importantes es la producción de penicilina en la industria farmacéutica. Debido a que su elaboración se basa en procesos de digestión anaerobia, se utilizan biorreactores de tipo batch, los cuales se caracterizan por tener una gran flexibilidad de operación y ventajas fundamentalmente cinéticas.

Los biorreactores, pueden estar sometidos a diferentes perturbaciones como es la presencia de compuestos inhibitorios, la variación de algún parámetro operacional (temperatura o pH), u otro efecto negativo. Es necesario realizar el estudio de los cambios en las comunidades microbianas, para determinar las condiciones más adecuadas, y lograr una mayor estabilidad del proceso de degradación. El análisis microbiológico se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas moleculares, permitiéndonos obtener información de las distintas comunidades presentes durante las diferentes condiciones estudiadas.

Considerando las ventajas que tienen los biorreactores nace la idea de conformar nuevas alternativas del control ambiental principalmente de los residuos que genera la operación de procesos químicos, apoyando de esta manera el estudio de diferentes tipos de biorreactores, estableciendo un proceso de producción característico para cada ramo de la industria.

ANTECEDENTES.

Los primeros productos, donde se utilizaron los biorreactores, se remontan a la elaboración de la cerveza, desde el año 3,000 a.c. en países nórdicos como Alemania o Inglaterra, donde los climas fríos favorecieron a cultivos como la cebada, la cual es la materia prima para la elaboración de este.

Se cree que en el siglo XV se descubrió una nueva versión de cerveza, a la cual se le había introducido un lúpulo durante su elaboración, lo cual le daba cierto sabor amargo, el cual era del agrado de la gente; por esta razón, se volvió muy popular a partir del siglo XVIII.

Fue hasta la edad media, que los monjes europeos mejoraron en gran parte el proceso y la utilización de los biorreactores que se utilizaban en la fabricación de la cerveza e institucionalizaron el uso del lúpulo por su sabor y sus propiedades como conservante.

En 1865, Luis Pasteur demostró que se requiere de la presencia de microorganismos para los procesos de fermentación en general; es decir, las del tipo alcohólica, butírica y láctica; también indica que la eliminación de los microorganismos anula el fenómeno de pasteurización (EUFIC, 2002).

El efecto Pasteur, demuestra que las levaduras tienen la capacidad de reproducirse en ausencia de oxígeno, es decir, su reproducción es de tipo anaerobia.

En 1928 el doctor Alexander Fleming descubrió que uno de los cultivos en su laboratorio en el hospital St. Mary, se contaminó accidentalmente con un hongo verde que se reproduce por esporas, denominado *Penicillium notatum*. Fleming observó que los gérmenes del área contaminada morían, por lo que concluyó que el hongo contenía una sustancia que las destruía, que fue llamada "penicilina". Lamentablemente, por falta de fondos monetarios no pudo continuar su estudio.

Fue hasta 1938, que H.W. Florey, patólogo australiano, y Ernest Chain, químico alemán, se unieron para buscar drogas antibacterianas. Ellos purificaron parcialmente la penicilina de Fleming, probando su potencia y amplio espectro, pero su cultivo para la producción en masa era difícil, ya que para obtener la penicilina suficiente para medio tratamiento de un enfermo era necesario el cultivo de 300 matraces.

En 1943 se encontró una nueva especie de *Penicillium*, el *Penicillium crysogenumque*, el cual daba un mejor rendimiento, se hizo además un cambio en el medio de cultivo, al sustituir las levaduras por "cornstee" se logró aumentar 10 veces el rendimiento.

El ingeniero bioquímico W. Dunn aportó nuevas técnicas para el cultivo en gran escala, sustituyendo los cultivos superficiales por técnicas de fermentación profunda en grandes tanques, con lo que dio inicio la producción de penicilinas biosintéticas y semisintéticas.

Al terminar la Segunda Guerra Mundial, ya había penicilina en cantidad suficiente. La penicilina G salió al mercado en 1941, pero fue utilizada por vez primera en la guerra entre Túnez y Sicilia en 1942 (Marín, 2010).

Se consideran penicilinas naturales las producidas por microorganismos, como son:

- Penicilina G (bencilpenicilina).
- Penicilina K (heptilpenicilina).
- Penicilina N (D-aminocarboximetilpenicilina).

Se consideran semisintéticas las obtenidas haciendo cambios en el medio de cultivo, como son la penicilina S y la penicilina V (fenoxi-metilpenicilina), las cuales se obtienen agregando al caldo de *Penicillium*, levaduras autolisadas como fuente de proteínas y 2 fenoxietanol, saliendo al mercado en 1953,. La síntesis total fue realizada por Sheenan, Henery-Logan en 1959. (Marin, 2010).

A partir de los años setenta, se han realizado avances en el área de la biología celular y la genética, además de mejorar los procesos de la producción de la insulina, el interferón o los plasmidios activadores, los cuales eran muy complicados y caros de fabricar. Otro aspecto importante de los biorreactores, ha sido que se han utilizado en el tratamiento y reutilización de productos residuales por métodos biotecnológicos, comúnmente llamados biorremediación (CAR/PL, 2003).

CAPÍTULO 1
BIORREACTOR

1.1 Definición de biorreactor.

Un biorreactor, es un recipiente o sistema, mediante el cual se transforman los sustratos de un medio de cultivo (materias primas) en metabolitos y/o en biomasa (productos), empleando para este fin microorganismos, células o enzimas (De Escalada, 2010)

Según Thomas (2005), un *“biorreactor es un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular. Estos dispositivos se encuentran en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos.”*

Considerando las definiciones de Thomas (2005) y De Escalada (2010) se puede decir que un biorreactor, es un equipo diseñado para poder llevar a cabo en su interior reacciones bioquímicas, debido a que se apoyan de sistemas microbianos, fungales, celulares o de plantas, para poder transformar la materia prima en productos de consumo humano.

1.2 Características de un biorreactor.

Un biorreactor es la parte principal de cualquier proceso bioquímico en el que se emplean sistemas microbianos, fungales, sistemas celulares mamíferos o plantas para la manufactura económica de una amplia variedad de productos útiles (Scragg, 1996).

Los bioreactores CSTR y batch, son diseñados comúnmente de forma cilíndrica; de acuerdo a la capacidad requerida, éstos varían en su volumen, desde algunos mililitros hasta metros cúbicos. Los materiales comúnmente utilizados para su fabricación son principalmente acero inoxidable y para recipientes pequeños se elaboran de vidrio.

En general, un biorreactor debe mantener ciertas condiciones ambientales que sean propicias para el organismo o sustancia química que se cultiva, las más importantes son:

- a) La concentración de biomasa, la cual debe permanecer alta.
- b) El mantenimiento de las condiciones estériles.
- c) Agitación efectiva para que la distribución de los sustratos y microorganismos en el reactor sea uniforme.
- d) El control de la temperatura y presión óptima.
- e) Monitoreo de pH constante.

La forma en la que se puede utilizar o manipular un biorreactor es de tres modos distintos, los cuales se basan en función de los flujos de entrada y salida; estas formas son:

- a) Lote: Durante su manejo en este tipo de reactor, se realizan las siguientes operaciones:
 1. Se agrega una carga de reactivo.
 2. Se lleva el reactor a condiciones de operación.
 3. Se mantiene a estas condiciones por un lapso de tiempo determinado (máximo días), durante los cuales se realiza la reacción.
 4. Se lleva al reactor a las condiciones necesarias para descargar el producto.
 5. Se lava el reactor.

Con los cinco pasos anteriores se conforma el llamado ciclo de operación. La característica principal en los reactores de este tipo, es la variación de las concentraciones dentro del reactor con el tiempo.

- b) Lote alimentado (*fed-batch*): Se caracteriza por que el flujo que es alimentado al reactor es continuo o semicontinuo. Según sea el objetivo de la operación, la adición intermitente del sustrato mejora la productividad de la reacción.
- c) Continuo o quimiostato. Trabajan con un flujo estable de alimentación y un flujo estable de salida de productos, para una posición fija a través del tiempo, no varía el grado de reacción y al variar el tiempo se tienen distintas composiciones de los productos finales.

CAPÍTULO 2
CLASIFICACIÓN DE LOS BIORREACTORES.

Los biorreactores pueden clasificarse con base en su diseño, operación y/o sus características biológicas, dependiendo de las aplicaciones industriales.

2.1 Clasificación por diseño

Actualmente en la industria estos tipos de biorreactores se dividen en tres grupos.

2.1.1 Biorreactores sin agitación ni aeración.

Este tipo de biorreactores, no cuentan con un sistema de agitación ni con un sistema de aeración. Su diseño es el más básico, debido a que no requiere una gran cantidad de instrumentos para su operación y por lo tanto su costo no es tan elevado como el de los biorreactores que si necesitan un sistema de agitación y/o de aeración. Debido a estas características, el 86% de la industria alimenticia lo utiliza para obtener productos para el consumo humano como es el caso del vino, la cerveza y el queso, en la figura 2 se muestra el diagrama básico de este tipo de biorreactores (Scragg, 1992).

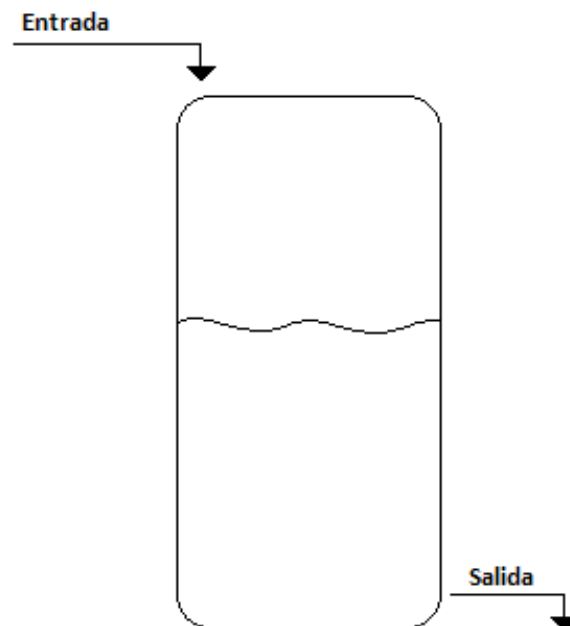


Figura 2. Biorreactor sin sistema de agitación ni aereación.

2.1.2 Biorreactores sin agitación, con aeración.

Los biorreactores que no cuentan con un sistema de agitación, pero que si operan con un sistema de aeración, como se muestran en la figura 3, son los que menos se utilizan en la industria con un 11% (Scragg, 1992).

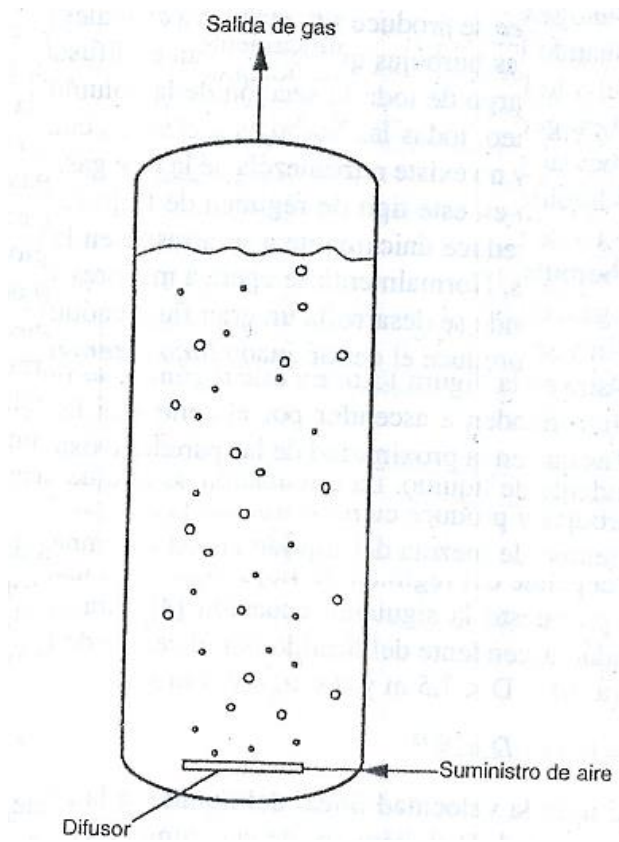


Figura 3. Biorreactor sin sistema de agitación y con aeración (Doran, 1998).

2.1.3 Biorreactores con agitación y aeración.

De acuerdo a Scragg (1992), los biorreactores que cuentan con un sistema de agitación y con un sistema de aeración, como se muestra en la figura 4, son utilizados en un 13%, para producir nuevos productos, donde se requieran características especiales para el crecimiento de los microorganismos y de esta manera se mejora la eficiencia del proceso, debido a las características que se requieren para este tipo de

biorreactor, su costo es el más elevado comparado con los 2 tipos de biorreactores mencionados anteriormente.

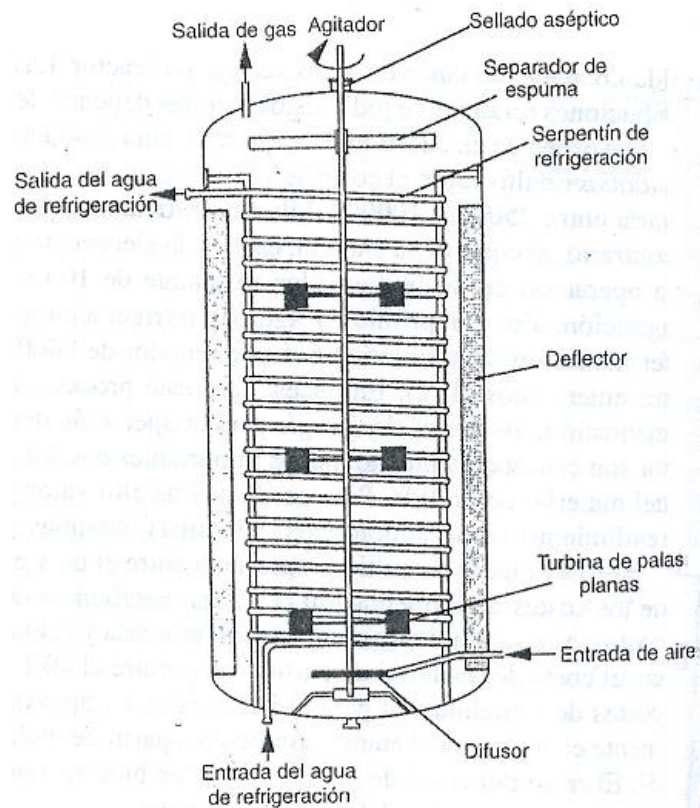


Figura 4. Biorreactor con sistema de agitación y aereación (Doran, 1998).

2.2. Clasificación operativa.

Tanto los reactores y los biorreactores se clasifican principalmente de acuerdo al modo de operación: biorreactor por lotes, biorreactor de mezcla completa (CSTR) y biorreactor de flujo pistón (PFR).

En los biorreactores el modo en cómo operan define el sistema de cultivo y delimita el bioproceso. Dependiendo del tipo de biorreactor (batch, CSTR o PFR) a utilizar en el proceso, se define la metodología a emplear para el sistema de cultivo, así como los parámetros y las características operativas para el diseño, con el fin de obtener el mayor rendimiento del proceso.

2.3 Clasificación biológica.

Los sistemas biológicos deben interactuar con el ambiente externo para poder crecer y desarrollarse; es por eso que los biorreactores se clasifican biológicamente de acuerdo al metabolismo procesal del sistema de cultivo, los cuales son:

2.3.1 Biorreactor anaerobio

Este tipo de biorreactores utiliza microorganismos anaerobios, los cuales sólo pueden desarrollarse en ausencia de cantidades significativas de oxígeno (O_2) y bajo condiciones de potenciales redox (Eh) reducidos, existen 3 tipos de microorganismos anaerobios.

- Los microorganismos microaerófilos, son aquellos que requieren niveles muy bajos de O_2 para crecer, de 2 a 10%, por lo que el oxígeno atmosférico es dañino, debido a que contiene un 21% de O_2 .
- Los anaerobios totales son aquellos microorganismos que pueden tolerar por un tiempo muy corto del oxígeno atmosférico.
- Los microorganismos anaerobios estrictos no pueden soportar ninguna cantidad de oxígeno y mueren en su presencia. (Rivas, C. y Mota, M., 2008).

2.3.2 Biorreactor aerobios

Este tipo de biorreactor utiliza microorganismos aerobios, los cuales utilizan el O_2 para poder desarrollarse, esto ocurre debido a que el proceso que se lleva a cabo dentro de ellos, utiliza el O_2 para reaccionar con los átomos de hidrógeno para formar agua, además de que unidos al carbono, producen CO_2 , todo esto ocurre después de haber participado en la producción de trifosfato de adenosina (ATP), la cual es utilizada en las funciones vitales de las células. (Rivas, C. y Mota, M., 2008).

Los bioprocesos de cultivo y las fermentaciones están basados en el metabolismo celular del cultivo. El metabolismo define los parámetros y características operativas-biológicas de diseño y de operación del biorreactor. Estas características son las que intervienen en la parte

biológica del sistema y tienen que ver con el crecimiento, productividad y rendimiento del cultivo.

Ambas clasificaciones; la biológica y la operativa, son procesalmente interdependientes, pero a la vez es muy importante tomarla en cuenta, ya que ambas afectan el diseño final del biorreactor.

La función operativa, como la biología tienen un propósito en particular, el cual es la producción de un cierto producto. Si existe una mala elaboración del bioproceso, el cultivo podría verse afectado y como consecuencia el cultivo podría llegarse a dañar o destruir, de la misma manera. Si el modo de cultivo no es el adecuado, el bioproceso no se podrá llevar a cabo de la forma en que fue diseñado.

CAPÍTULO 3.
BIORREACTORES Y TIPOS DE CULTIVO.

Los sistemas biológicos que determinan el metabolismo celular de cultivo y el modo procesal-biológico del sistema son definidos con base en el tipo de microorganismo que utilicen, estos pueden ser anaeróbicos, facultativos o aeróbicos, cada uno se diferencia en base al tipo de metabolismo que lo rige, ya sea:

- a) Anabólico, consiste en la fase constructiva del metabolismo y tiene lugar la biosíntesis de componentes moleculares de las células como los son las proteínas, los polisacáridos y los lípidos, los cuales se forman de moléculas sencillas, además utiliza la energía del ATP, la cual fue almacenada después del catabolismo.
- b) Catabólico, el cual es la fase degradativa del metabolismo, lo que quiere decir que descompone moléculas relativamente grandes, como lo son los lípidos, las proteínas y los glúcidos, para producir moléculas más pequeñas como lo son el ácido láctico, el ácido acético, el CO₂ o el amoniaco, además que durante el proceso de degradación, se libera energía a las moléculas orgánicas, las cuales ayudan a la conservación del ATP.

3.1 Células y microorganismos anaeróbicos.

Bacterias en su gran mayoría, son microorganismos del tipo catabólico, lo que quiere decir que su metabolismo es degradativo, generalmente estos microorganismos son autónomos y nutricionalmente independientes, sus células no respiran y por lo tanto no utilizan la glucólisis para la respiración celular; en cambio utilizan vías alternas, donde una molécula orgánica, producida durante el proceso metabólico, es utilizada como aceptor de electrones, en un proceso bioquímico conocido como respiración oxidativa; esta molécula es reducida a producto orgánico en un proceso comúnmente denominado fermentación.

3.2 Células y microorganismos aeróbicos.

Son células las cuales se pueden encontrar dentro del reino Eucariota principalmente, y existen muy pocos en el procariota. Son microorganismos y células que utilizan la glucólisis como forma de respiración celular, por lo que su metabolismo es constructivo o del tipo anabólico y deben obtener sus nutrientes de diferentes fuentes. Sus principales grupos están

representados por: bacterias y microorganismos aeróbicos, plantas y animales; cuyas células se puedan cultivar en suspensiones celulares o bien, en diferentes arreglos artificiales.

3.3 Células y microorganismos facultativos.

Estos microorganismos son ambivalentes, tienen la capacidad de vivir o sobrevivir entre ambientes: aeróbico y anaeróbico, son microorganismos de metabolismo mixto por lo que, se pueden degradar o construir materia orgánica, a partir de diferentes tipos de sustratos, es decir orgánicos como inorgánicos, debido a estas características son muy versátiles, sin embargo sus mayores representantes son microorganismos los cuales presentan relaciones parásitas o del tipo simbiotes tales como lo son los hongos y las levaduras.

CAPÍTULO 4.
BIOCATÁLISIS

La biocatálisis es también conocida como catálisis enzimática o biotransformación, es el proceso químico mediante el cual las enzimas realizan reacciones entre los componentes orgánicos.

La biocatálisis, es el uso de enzimas para catalizar reacciones químicas; el uso o manipulación de éstas, puede ser de manera aislada o como células enteras. Los catalizadores enzimáticos ofrecen ventajas como la mejora de la eficiencia en el proceso, reducción del tiempo de reacción, etc sobre los catalizadores tradicionales.

4.1 Biocatalizador.

Los biocatalizadores son sustancias que hacen posible las reacciones químicas en las células y organismos de naturaleza proteica; actúan bajando la energía de activación. Sus funciones son sintetizar nuevas moléculas y degradar las existentes. Son los catalizadores de la naturaleza que reducen la cantidad de energía necesaria para que se pueda producir una reacción química en un ser vivo.

Los avances en el campo de la biotecnología han hecho que los procesos biotecnológicos sean una buena alternativa para la obtención de productos más eficaces, adecuados para realizar modificaciones químicas producidas sobre un compuesto orgánico por organismos vivos, los cuales generalmente son microorganismos y/o cultivos de células.

La biocatálisis consiste en la utilización del poder catalítico de las enzimas que intervienen en el metabolismo celular de los organismos vivos sobre sustratos, los biocatalizadores, tienen una gran importancia en el desarrollo industrial, ya que estos se utilizan constantemente en el desarrollo de procesos industriales para obtener productos más eficientes.

A continuación se muestra en la Tabla 1, las aplicaciones industriales donde el proceso ha sido factible y eficaz.

Tabla 1: Ejemplos de las aplicaciones de las enzimas en la industria.

Enzima	Fuente	Aplicación industrial	Industria
Amilasa	Hongos	Pan	Panadera
	Bacterias	Revestimientos amiláceos	Papelera
	Hongos	Fabricación de jarabe y glucosa	Alimentaria
	Bacterias	Almidonado en frío de la ropa	Almidón
	Hongos	Ayuda digestiva	Farmacéutica
	Bacterias	Eliminación de revestimientos	Textil
	Bacterias	Eliminación de manchas; detergentes	Lavandería
Proteasa	Hongos	Pan	Panadera
	Bacterias	Eliminación de manchas	Limpieza en seco
	Bacterias	Ablandador de la carne	Cárnica
	Bacterias	Limpieza de las heridas	Medicina
	Bacterias	Eliminación de revestimientos	Textil
	Bacterias	Detergente doméstico	Lavandería
	Levadura	Relleno de caramelos	Confitería
Glucosa Oxidasa	Hongos	Eliminación de glucosa y oxígeno, papeles para pruebas de la diabetes	Alimentaria Farmacéutica
		Jarabe de cereales rico en glucosa	Bebidas refrescantes
Pectinasa	Hongos	Prensado, clarificación del vino	Zumos de frutas
Renina	Hongos	Coagulación de la leche	Quesera
Celulasa	Bacterias	Suavizante y abrillantador de tejidos; detergente	Lavandería
Lipasa	Hongos	Degradar la grasa	Lechería, lavandería
Lactasa	Hongos	Degradar la lactosa a glucosa y galactosa	Lechería, alimentos
DNA polimerasa	Bacterias; Archea	Replicación del DNA por PCR	Investigación biológica y forense.

(Enríquez, 2012)

4.2 Clasificación de los biocatalizadores.

Los Biocatalizadores, tienen su aplicación en el desarrollo de procesos industriales para obtener Productos sin residuos o con un mínimo de residuos biodegradables, según la función que ejercen se clasifica de la siguiente manera:

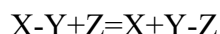
- a) Oxidorreductasas. Esta clase contiene las enzimas que eliminan oxígeno y/o glucosa para impedir la oxidación y oscurecimiento de los alimentos.

Las enzimas oxidorreductasas se utilizan en la industria papelera, para reforzar el proceso “*bleach-boosting*” el cual consiste en blanquear el papel.

Las enzimas deshidrogenasas tienen su utilización en la rama de la medicina, ya que son utilizadas para tratar a las personas intoxicadas por alcohol (Castillo, 2005).

Las enzimas oxidasas son utilizadas en la industria alimentaria como un aditivo clasificado como antioxidante, conservador y estabilizador. En la fabricación del pan, se utiliza para dar un mayor volumen y textura a la masa. Si se aplica en el proceso de fermentación del vino, disminuye la cantidad de glucosa, lo cual hace que se obtenga una bebida con bajo contenido de alcohol. En la industria textil, se utiliza para los procesos de blanqueado de las telas (Garay, 2013).

- b)** Transferasas. Catalizan transferencia de grupos funcionales entre moléculas distintas, estas enzimas transfieren un grupo de un sustrato (la donante) a otra (el aceptor) de acuerdo a la siguiente reacción:



La enzima glucosil-transferasa se utiliza en la producción de ciclodextrina, a partir del almidón (Huerta, 2004).

La enzima transglutaminasa es de gran importancia en la industria alimenticia, debido a sus aplicaciones en el sector cárnico, pesquero, lácteo y de panadería.

En los cárnicos y productos pesqueros ayuda a mejorar sus características físicas, como son la firmeza, elasticidad, viscosidad, termoestabilidad, así como en aumentar la capacidad de retener líquidos. En los productos lácteos aumenta el rendimiento en la producción de quesos y mejora la textura de los yogures, además de que ayuda a reducir los costes. Para productos de panadería ayuda en mejorar el volumen, textura y elasticidad de la masa (BDF, 2015).

- c)** Hidrolasas. Rompen enlaces en las moléculas al añadir moléculas de agua, catalizan la escisión hidrolítica de enlaces: C-O, C-N, C-C.

Las enzimas fosfatasas se utilizan en las industrias de aceites y grasas, en el desengomado de aceites; así como la producción de lisolecitina, la cual sirve como agente emulsionante,

Las enzimas lipasas sirven para hidrolizar triglicéridos y ésteres. Se utilizan para la fabricación de grasas “a medida” con reacciones de interesterificación, además de la síntesis de ésteres para producción de tensoactivos. En la industria papelera se utiliza para eliminar restos de savia y depósitos de resina en la pasta papelera y en las máquinas; en la industria de los detergentes, ayuda a eliminar manchas de aceite y grasa (Castillo, 2005).

En la industria alimentaria, las enzimas lipasas ayudan a la maduración acelerada de quesos, en reacciones de esterificación, así como aditivo en alimentos para animales domésticos (García, 1993).

La enzima amilasa es utilizada en la industria textil, para eliminar el almidón de los hilos de algodón, ya que trabajan de manera más eficiente que los métodos a base de reacciones químicas con ácidos. Además de que no generan residuos peligrosos para el medio ambiente, en la industria alimentaria, se utiliza como aditivo en la producción de la cerveza y en la elaboración del pan (García, 1993).

- d) Liasas. Rompen enlaces por mecanismos distintos a la hidrólisis o la oxidación, catalizan reacciones de ruptura de sustratos.

Las enzimas pectato liasa son utilizadas en la industria alimenticia, ya que ayudan en la clarificación de jugos y vinos, también son utilizadas en la industria textil, para el enriado del lino y el decrudado del algodón.

La enzima aspártico descarboxilasa se utiliza en la producción de L-alanine a partir del ácido L-aspártico.

La enzima histidasa es usada en la industria de los cosméticos.

La enzima acetolacto descarboxilasa se utiliza en la industria alimenticia para la fabricación de la cerveza (Huerta, 2004).

- e) Isomerasas. Estas enzimas catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula; es decir catalizan la transformación de una molécula en su isómero.

Las enzimas isomerasas son utilizadas en la industria alimenticia, en donde su función es la de convertir la glucosa en fructuosa a partir de sustancias ricas en almidón y obtener jarabes que potencian las propiedades edulcorantes y reducen las calorías manteniendo el mismo nivel de dulzor, también son utilizadas en la elaboración de los helados, ya que mejora la textura quitándole la sensación “arenosa” provocada por la cristalización, además de permitir la utilización de jarabes de alta fructuosa para su elaboración (Castillo, 2005).

- f) Ligasas y Sintetasas. Catalizan la unión de moléculas o grupos con la energía del ATP.

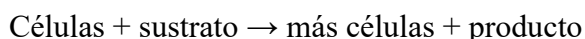
- Sintetasas.
- Carboxilasas.

CAPÍTULO 5.
CINÉTICA Y ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN Y
MONOD.

5.1 Cinética.

La cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Recibe este nombre en honor a Leonor Michaelis y Maude Menten. Este modelo sólo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima, y para condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la concentración del complejo enzima-sustrato es constante.

La cinética de Monod describe la velocidad de reacción en procesos microbianos, es decir, aquellos en donde la reacción necesita una cierta cantidad de microbios o células para poder transformar la materia orgánica en productos, obteniéndose como subproducto más células o microbios.



Un aspecto importante es el crecimiento celular, el cual se divide en 4 fases, como se muestra en la figura 5, las cuales son:

Fase I, llamada fase de latencia, la concentración de las células casi no aumenta, debido a que se están adaptando a su entorno para posteriormente reproducirse.

La fase II, llamada fase de crecimiento, debido a que la velocidad de crecimiento de las células aumenta de forma exponencial, aprovechando los nutrientes en el sistema.

La fase III, es la fase estacionaria, en la cual la tasa de crecimiento de las células es de cero, debido a que se han agotado los nutrientes. Muchos productos de la industria se obtienen en esta fase, por ejemplo la penicilina, la cual se elabora empleando el hongo *penicillium chrysogenum*. Otra de las causas que puede detener el crecimiento, es la acumulación de materiales tóxicos generados durante la fase de crecimiento.

La fase IV, es la fase de muerte, en la cual existe una disminución en la concentración de células, debido a los subproductos tóxicos (Fogler, 2001).

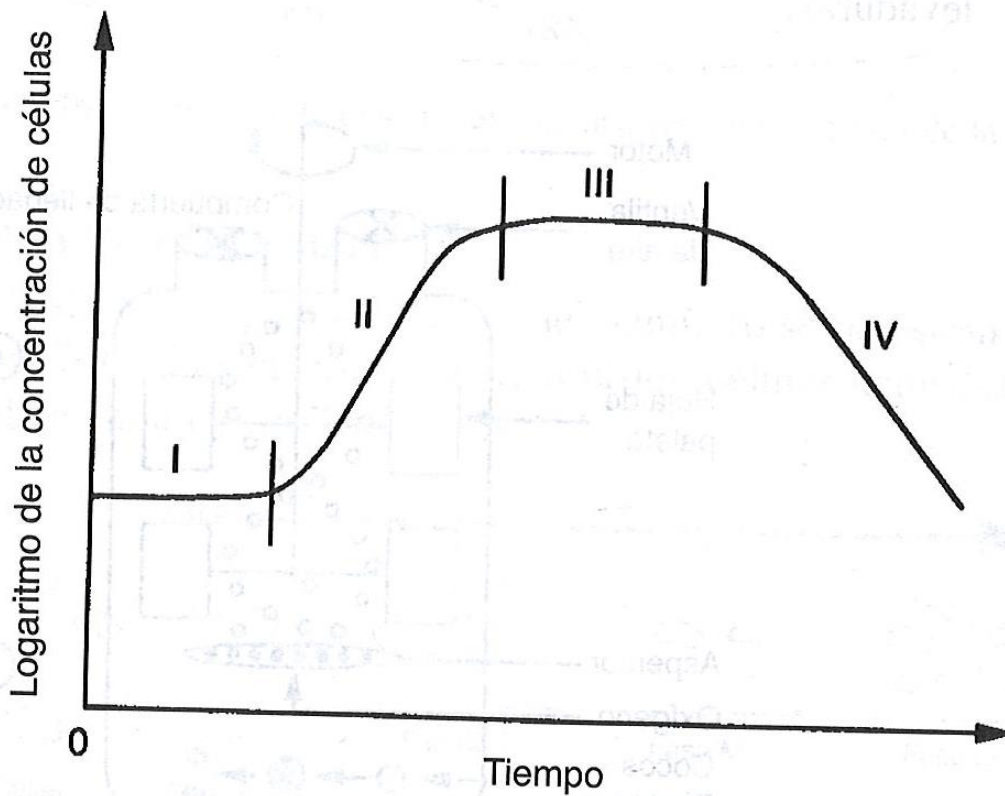


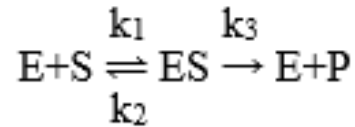
Figura 5. Fases del crecimiento de células

5.2 Ecuación de Michaelis-Menten.

Postulados es los que se basa la ecuación de Michaelis-Menten:

- El complejo enzima-sustrato $[ES]$ se encuentra en estado estacionario, lo que quiere decir que la concentración de $[ES]$ es constante, por lo tanto $\frac{d[ES]}{dt} = 0$
- En el momento de saturación toda la enzima $[E]$ se convierte en $[ES]$ y la concentración de $[E]$ tiende a 0.
- La V_{max} coincide con el momento de saturación.

Basándonos en la siguiente ecuación, en donde se presenta una fase intermedia en donde se forma el complejo enzima-sustrato.



$$v_1 = k_1 [E][S] \quad 5.1$$

$$v_2 = k_2 [ES] \quad 5.2$$

$$v_3 = k_3 [ES] \quad 5.3$$

$$v_1 = v_2 + v_3$$

$$0 = v_1 - (v_2 + v_3) \quad 5.4$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad 5.5$$

Igualando 5.4 con 5.5

$$\frac{d[ES]}{dt} = v_1 - (v_2 + v_3) \quad 5.6$$

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad 5.7$$

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad 5.8$$

Sustituyendo 5.1, 5.2 y 5.3 en 5.4

$$0 = k_1 [E][S] - (k_2 [ES] + k_3 [ES])$$

$$0 = k_1 [E][S] - k_2 [ES] - k_3 [ES] \quad 5.9$$

Sustituyendo 5.8 en 5.9

$$0 = k_1 ([E_T] - [ES])[S] - k_2 [ES] - k_3 [ES] \quad 5.10$$

$$0 = k_1 ([E_T][S] - [ES][S]) - k_2 [ES] - k_3 [ES] \quad 5.11$$

$$0 = k_1 [E_T][S] - k_1 [ES][S] - k_2 [ES] - k_3 [ES] \quad 5.12$$

Despejando $k_1 [ET][S]$

$$k_1 [E_T][S] = k_1 [ES][S] + k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad 5.13$$

Sacando $[ES]$ como factor común.

$$k_1[E_T][S] = [ES] (k_1[S] + k_2 + k_3) \quad 5.14$$

Despejando $[ES]$

$$[ES] = \frac{k_1[E_T][S]}{k_1[S] + k_2 + k_3} \quad 5.15$$

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{[S] + \frac{k_2+k_3}{k_1}} \quad 5.16$$

$$k_m = \frac{k_2+k_3}{k_1} \quad 5.17$$

Sustituyendo 5.17 en 5.16

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{[S] + k_m} \quad 5.18$$

Despejando $[ES]$ de 5.3

$$[ES] = \frac{v_3}{k_3} \quad 5.19$$

Sustituyendo 5.19 en 5.18

$$\frac{v_3}{k_3} = \frac{[E_T][S]}{[S] + k_m} \quad 5.20$$

Despejando “ v_3 ” de 5.20

$$v_3 = \frac{k_3[E_T][S]}{[S] + k_m} \quad 5.21$$

Si $[S]$ es muy alta $v_3 \rightarrow v_{max}$

Si $[S] \gg k_m$ $v_3 = v_{max}$ y k_m tiende a 0

$$v_{max} = \frac{k_3[E_T][S]}{[S] + 0} \quad 5.22$$

$$v_{max} = k_3[E_T] \quad 5.23$$

Despejando k_3 de 5.23

$$k_3 = \frac{v_{max}}{[E_T]} \quad 5.24$$

Sustituyendo 5.24 en 5.21

$$v_3 = \frac{\left(\frac{v_{max}}{[E_T]}\right)[E_T][S]}{[S]+k_m} \quad 5.25$$

Finalmente obtenemos la ecuación de Michaelis–Menten.

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S]+k_m} \quad 5.26$$

En donde:

E = enzima

ES = complejo enzima-sustrato

E_T = enzima total

k_m = constante de Michaelis-Menten.

P = producto

S = sustrato

v = velocidad

v_{max} = velocidad máxima

Si se grafica la ecuación de Michaelis-Menten, se obtiene la gráfica de la figura 6, en donde se puede observar que en cuanto aumenta concentración del sustrato, aumenta la velocidad, la cual llega un punto máximo, este punto se le denomina velocidad máxima. Tomando en cuenta la mitad de la velocidad máxima, se puede obtener gráficamente el valor de la constante de Michaelis-Menten.

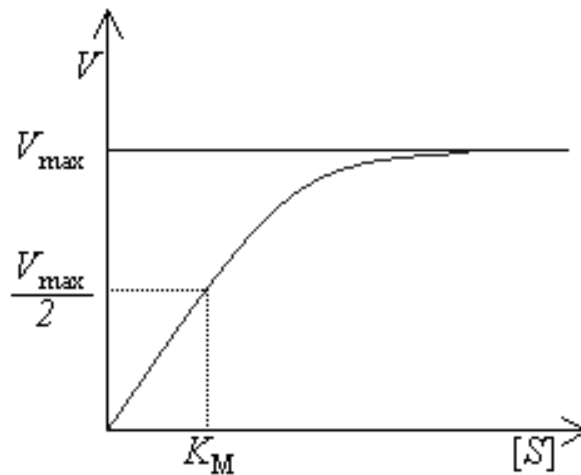


Figura 6. Diagrama de velocidad de reacción y constante de Michaelis-Menten.

5.3 Consideraciones importantes sobre la cinética de Michaelis-Menten:

Cuando el valor numérico de K_m es pequeño, esto refleja una alta afinidad de la enzima por su sustrato porque a una baja concentración del mismo, la enzima ha desarrollado ya la mitad de la velocidad máxima.

Cuando el valor numérico de K_m es grande, esta refleja una baja afinidad de la enzima por su sustrato, porque a una concentración elevada del mismo, la enzima desarrolla la mitad de la velocidad máxima.

Cuando la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de la enzima a cualquier concentración de sustrato. Por ejemplo, si la concentración de enzima es disminuida a la mitad, la velocidad inicial de la reacción (v_0) es reducida también a la mitad de la original.

Cuando $[S]$ es más pequeña que la K_m , la velocidad de la reacción es aproximadamente igual a la concentración de sustrato.

5.4 Gráfico de Lineweaver-Burk.

Cuando se tienen reacciones enzimáticas, los dos parámetros clave de ley de velocidad son la $V_{\text{máx}}$ y K_m . si se grafica la velocidad de la reacción (v) contra la concentración de substrato ($[S]$) no siempre es posible determinar la condición en que se ha llegado a la velocidad máxima (V_{max}) debido al incremento de la pendiente en la hipérbola a concentraciones de substrato elevadas.

Aun así, si se grafica una doble recíproca, es decir, el inverso de la velocidad ($1/v$) contra el inverso de la concentración de substrato ($1/[S]$), se obtiene una línea recta, a este gráfico se le conoce como gráfico de Lineweaver-Burk, o gráfico de “dobles recíprocas”, el cual se utiliza para calcular k_m y V_{max} así como para determinar el mecanismo de acción de los diversos tipos de inhibidores.

Tomando por ejemplo los datos de la tabla 2 de la urea:

Tabla 2: Datos de la concentración de la urea contra la velocidad de reacción (Fogler, 2001).

C_{urea} (kmol/m ³)	$-r_{\text{urea}}$ (kmol/m ³ ·s)	$1/C_{\text{urea}}$ (m ³ /kmol)	$1/-r_{\text{urea}}$ (m ³ ·s/kmol)
0.20	1.08	5.0	0.93
0.02	0.55	50.0	1.82
0.01	0.38	100.0	2.63
0.005	0.20	200.0	5.00
0.002	0.09	500.0	11.11

Se puede elaborar la gráfica Lineweaver-Burk, como se muestra en la figura 7, la cual es de una línea recta de pendiente positiva.

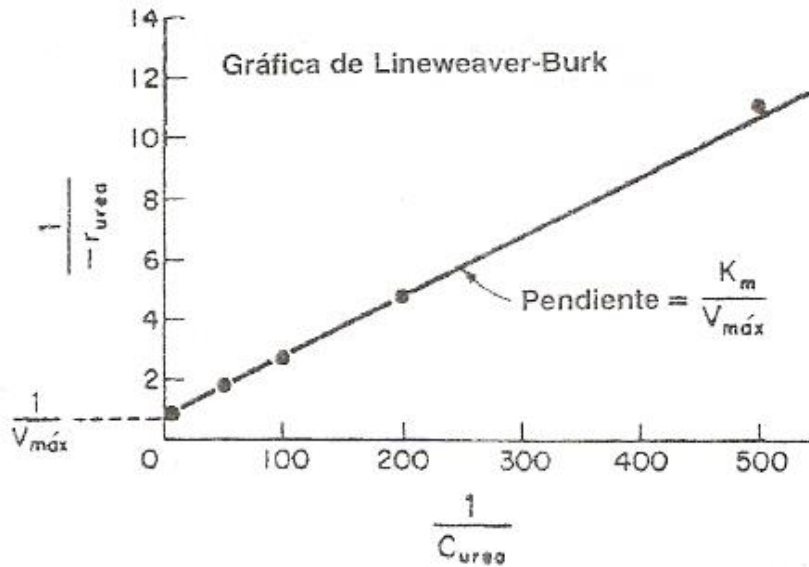


Figura 7: Gráfica de Lineweaver-Burk

La ecuación que describe a la gráfica de Lineweaver-Burk es:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad 5.27$$

Describe una recta en donde el intercepto con el eje de las abscisas es igual a $-1/K_m$ y el intercepto con el eje de las ordenadas es igual a $1/V_{max}$.

5.5 Ecuación de Monod.

Debido a que en una reacción microbiana la velocidad de crecimiento de las células o microbios dependen de la cantidad de nutrientes que se encuentran en el sistema, en ocasiones solamente un sustrato es el que se encarga de dominar la velocidad de crecimiento de las mismas, por lo general, es aquel nutriente que proporciona una fuente de importante de carbono o de nitrógeno, durante este crecimiento, la velocidad está relacionada con la

concentración del sustrato limitante del crecimiento, expresada por la ecuación de Monod para crecimiento exponencial, la cual es la siguiente:

$$r_g = \mu C_C \quad 5.28$$

Donde:

r_g = velocidad de crecimiento de la célula

C_C = concentración de células

μ = velocidad de crecimiento específico

La velocidad de crecimiento específico de la célula se puede expresar como:

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad 5.29$$

Donde:

μ_{max} = velocidad de reacción específica de crecimiento máxima

K_S = constante de Monod

C_S = concentración del sustrato limitante

Combinando las ecuaciones 5.28 y 5.29, se obtiene la ecuación de Monod para la velocidad de crecimiento de células bacterianas.

$$r_g = \frac{\mu_{max} C_S C_C}{K_S + C_S} \quad 5.30$$

Por lo general los valores de K_S son muy pequeños, del orden de mg/L, por lo que el crecimiento es representado por una cinética de orden cero, y la ley de velocidad se reduce a:

$$r_g = \mu_{max} C_C \quad 5.31$$

La velocidad de crecimiento r_g por lo general, depende de la concentración de más de un nutrimento, sin embargo, el nutrimento limitante suele ser el que se emplea en la ecuación 5.31.

En muchos sistemas, el producto inhibe la velocidad de crecimiento, por lo que existen varias ecuaciones distintas para tomar en cuenta la inhibición; una ley de velocidad de este tipo toma la forma empírica:

$$r_g = k_{obs} \frac{\mu_{max} C_S C_C}{K_S + C_S} \quad 5.32$$

Donde:

$$k_{obs} = \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^n \quad 5.33$$

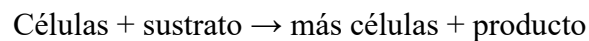
C_p^* = concentración de producto en la cual todo metabolismo cesa

n = constante empírica.

La ecuación de Monod es normalmente utilizada para la velocidad de crecimiento y la concentración del sustrato, en donde se considera un crecimiento controlado, por lo que no es utilizada cuando el crecimiento cambia rápidamente (Doran, 1998).

5.5.1 Estequiometria

La estequiometria del crecimiento celular, varía con el sistema de microorganismos, nutrimentos y las condiciones ambientales, como lo son el pH, la temperatura y potencial redox. Si consideramos que el crecimiento celular es limitado únicamente por un solo nutrimento en el medio de cultivo, tenemos que:



El coeficiente de rendimiento para células y sustrato es:

$$Y_{C/S} = \frac{\text{Masa de nuevas células formadas}}{\text{Masa de sustrato consumido}} = - \frac{\Delta C_C}{\Delta C_S} \quad 5.34$$

Con $Y_{C/S} = \frac{1}{Y_{S/C}}$

Cuando la formación de producto ocurre durante la fase de crecimiento exponencial, la velocidad de formación de producto es:

$$r_p = Y_{p/c} r_g = Y_{p/c} \mu C_C = Y_{p/c} \frac{\mu_{m\acute{a}x} C_C C_S}{K_S + C_S} \quad 5.35$$

Donde:

$$Y_{p/c} = \frac{\text{Masa de producto formado}}{\text{Masa de nuevas células formadas}} = -\frac{\Delta C_p}{\Delta C_c} \quad 5.36$$

El producto de $Y_{p/c}$ y μ comúnmente se le llama, tasa específica de formación de producto, q_p , (masa de producto/volumen/tiempo). Cuando el producto se forma en la fase estacionaria, es posible relacionar la tasa de formación de producto con el consumo de sustrato por:

$$r_p = Y_{p/s} (-r_s) \quad 5.37$$

El coeficiente de rendimiento estequiométrico que relaciona la cantidad de producto formado por masa de sustrato consumido es:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Masa de producto formado}}{\text{Masa de sustrato consumido}} = -\frac{\Delta C_p}{\Delta C_s} \quad 5.38$$

Además de consumir el sustrato para producir nuevas células, una parte del sustrato se utiliza para mantener las actividades normales de las células, el cual se representa como:

$$m = \frac{\text{Masa de sustrato consumida para mantenimiento}}{\text{Masa de células} \cdot \text{Tiempo}}$$

La tasa de consumo de sustrato para mantenimiento, sin importar que las células estén o no en crecimiento, es:

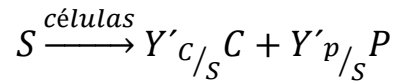
$$r_{sm} = m C_C \quad 5.39$$

Cuando el mantenimiento es despreciable, podemos relacionar la concentración de células formadas con la cantidad de sustrato consumida por la ecuación:

$$C_C = Y_{C/S} [C_{S0} - C_S] \quad 5.40$$

Esta ecuación puede emplearse para reactores de flujo continuo y también intermitentes.

Si es posible distinguir el sustrato (S) consumido en presencia de células para formar nuevas células (C) del sustrato consumido para formar producto (P), esto es.



Los coeficientes de rendimiento se pueden escribir como:

$$Y'_{c/s} = \frac{\text{Masa de sustrato consumida para formar nuevas células}}{\text{Masa de nuevas células formadas}} \quad 5.41$$

$$Y'_{p/s} = \frac{\text{Masa de sustrato consumido para formar producto}}{\text{Masa de producto formado}} \quad 5.42$$

Relacionando la tasa de consumo de nutrientes, $-r_s$, con las velocidades de crecimiento celular, la generación de producto y el mantenimiento celular, podemos decir que:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Tasa neta de} \\ \text{consumo de} \\ \text{sustrato} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{a la que es} \\ \text{consumido} \\ \text{por las células} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{a la que es} \\ \text{consumido para} \\ \text{formar producto} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{a la que es} \\ \text{consumido para} \\ \text{mantenimiento} \end{array} \right]$$

$$-r_s = Y'_{s/c} r_g + Y'_{s/p} r_p + mC_c$$

Si el producto se sintetiza durante la fase de crecimiento, puede que no sea posible separar la cantidad de sustrato consumida para crecimiento celular de la que se consume para sintetizar producto, por lo que todo el sustrato consumido se agrupa en el coeficiente estequiométrico, $Y_{s/c}$, y la velocidad de desaparición de sustrato es:

$$-r_s = Y_{s/c} r_g + mC_c \quad 5.43$$

Como no hay crecimiento durante la fase estacionaria, la ecuación 5.43 no puede ser utilizada para explicar el consumo de sustrato. En esta fase, el nutriente requerido para el crecimiento prácticamente se agota, por lo que se emplea un nutriente distinto, llamado nutriente secundario, el cual sirve para mantenimiento de la célula y para sintetizar el

producto deseado. En general, la ley de velocidad para la formación de producto durante la fase estacionaria es similar a la ecuación de Monod, la cual es:

$$r_p = \frac{k_p C_{sn} C_c}{K_{sn} + C_{sn}} \quad 5.44$$

Donde:

k_p = constante específica de velocidad con respecto al producto

C_{sn} = concentración del nutrimento secundario

C_c = concentración de células

K_{sn} = constante de Monod

$$r_p = Y_{p/sn} (-r_{sn})$$

La velocidad neta de consumo de nutrimento secundario durante la fase estacionaria es:

$$-r_{sn} = m C_c + Y_{sn/p} r_p \quad 5.45$$

Sustituyendo 5.44 en 5.45 tenemos:

$$-r_{sn} = m C_c + \frac{Y_{sn/p} k_p C_{sn} C_c}{K_{sn} + C_{sn}} \quad 5.46$$

Como el producto deseado puede sintetizarse cuando no hay crecimiento celular, es mejor relacionar la concentración del producto con el cambio de concentración de nutrimento secundario. Para un sistema intermitente, la concentración de producto, C_p , que se forma después de un tiempo t en la fase estacionaria puede relacionarse con la concentración de sustrato C_s , en ese tiempo (Fogler, 2001).

$$C_p = Y_{p/s} (C_{sn0} - C_{sn}) \quad 5.47$$

5.5.2 Balances de masa

Una forma de explicar el crecimiento de los microorganismos es mediante un balance de masa en un biorreactor continuo de mezcla perfecta de volumen constante, tomando en cuenta la masa de las células vivas, el cual es:

$$\begin{bmatrix} \text{Velocidad de} \\ \text{acumulaci3n} \\ \text{de c3lulas} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Velocidad de} \\ \text{entrada} \\ \text{de c3lulas} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{Velocidad} \\ \text{de salida} \\ \text{de c3lulas} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{Velocidad neta} \\ \text{de generaci3n} \\ \text{de c3lulas vivas} \end{bmatrix}$$

$$V \frac{dC_c}{dt} = v_0 C_{c0} - v C_c + (r_g - r_d) V \quad 5.48$$

El balance de sustrato correspondiente es:

$$\begin{bmatrix} \text{Velocidad de} \\ \text{acumulaci3n} \\ \text{de sustrato} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Velocidad de} \\ \text{entrada} \\ \text{de sustrato} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{Velocidad} \\ \text{de salida} \\ \text{de sustrato} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{Velocidad de} \\ \text{generaci3n} \\ \text{de sustrato} \end{bmatrix}$$

$$V \frac{dC_s}{dt} = v_0 C_{s0} - v C_s + r_s V \quad 5.49$$

En la mayoría de los sistemas la concentraci3n de entrada del microorganismo C_{c0} es cero.

En un sistema intermitente $v = v_0 = 0$ y los balances de masa son los siguientes:

- C3lulas

$$V \frac{dC_c}{dt} = r_g V - r_d V \quad 5.50$$

Dividiendo entre el volumen del reactor V se tiene

$$\frac{dC_c}{dt} = r_g - r_d \quad 5.51$$

- Sustrato

La velocidad de desaparici3n de sustrato $-r_s$, se deriva del sustrato empleado para crecimiento celular y el sustrato empleado para mantenimiento celular:

$$V \frac{dC_s}{dt} = r_s V = Y_{S/C} (-r_g) V - m C_c V \quad 5.52$$

Dividiendo entre V se obtiene el balance de sustrato para la fase de crecimiento

$$\frac{dC_s}{dt} = Y_{S/C} (-r_g) - m C_c \quad 5.53$$

Para c3lulas en fase estacionaria, el mantenimiento celular y la formaci3n de productos son las 3nicas reacciones que consumen sustrato, bajo estas condiciones, el balance de sustrato sería:

$$V \frac{dC_S}{dt} = Y_{S/p} (-r_p) V - m C_C V \quad 5.54$$

- Producto

La velocidad de formación de producto r_p , puede relacionarse con la velocidad de consumo del sustrato a través del siguiente balance:

$$V \frac{dC_p}{dt} = r_p V = Y_{p/s} (-r_s) V \quad 5.55$$

Durante la fase de crecimiento también es posible relacionar la velocidad de formación de producto r_p , con la velocidad de crecimiento celular r_g (Fogler, 2001).

CAPÍTULO 6.

**ANALISIS DE LOS BIORREACTORES TIPO BATCH, CSTR, PFR PARA LA
PRODUCCIÓN DE LA PENICILINA.**

Para la selección de un biorreactor se deben de considerar diferentes aspectos como por ejemplo: el tiempo de producción, la cinética de reacción, la cantidad del producto que se desea obtener con un rendimiento eficiente, así como el tipo de operación entre otros; por lo que es recomendable que el ingeniero químico realice un análisis sobre el comportamiento dinámico para determinar cuál es el tipo de biorreactor que sea más eficiente de acuerdo al proceso que se requiera.

A continuación se muestra un ejemplo sobre el estudio del comportamiento dinámico que tienen los biorreactores de tipo batch, CSTR y PFR (que se han estado revisando en este trabajo), para la producción de la penicilina utilizando como biomasa el *Penicillum chrysogenum*.

Las condiciones que se utilizaron para el diseño del biorreactor, ya fuera tipo batch, PFR y CSTR son:

$$V=30 \text{ L.}$$

$$T= 18.7 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$k_1 = 0.0312$$

$$k_2= 47.70$$

$$k_3= 3.374$$

$$k_4= 0.01268$$

Estos son los datos reportados en el artículo “*Numerical Methods for Chemical Engineers with MATLAB Applications*” con una confiabilidad del 95%. (Constantinides, 1999)

6.1 Biorreactor tipo batch

A continuación se realiza el análisis dinámico para el biorreactor de tipo batch.

Las ecuaciones que de acuerdo a Constantinides (1999), son:

$$\frac{dy_1}{dt} = k_1 y_1 \left[1 - \frac{y_1}{k_2} \right] \quad 6.1$$

$$\frac{dy_2}{dt} = k_3 y_1 - k_4 y_2 \quad 6.2$$

Donde:

$\frac{dy_1}{dt}$ =Evolución de la concentración de biomasa respecto el tiempo

$\frac{dy_2}{dt}$ =Evolución de la concentración de la penicilina

k1= constante

k2= constante

k3= constante

k4= constante

Posteriormente, se realizó el programa computacional para resolver las ecuaciones 6.1 y 6.2.

Utilizando el programa MATLAB

```
function penicilinalogbatch
clear all;close all; clc;
k1=0.0312; k2=47.7; k3=3.374; k4=0.01268;
y1=5; y2=0; dt=1; nit=2000;
for t=1:nit
    y1=y1+dt*k1*y1*(1-y1/k2);
    y2=y2+dt*(k3*y1-k4*y2);
    figure(1)
    plot(t,y1, '.');hold on;
    figure (2)
    plot (t,y2, '.');hold on;
end
```

Las gráficas obtenidas son:

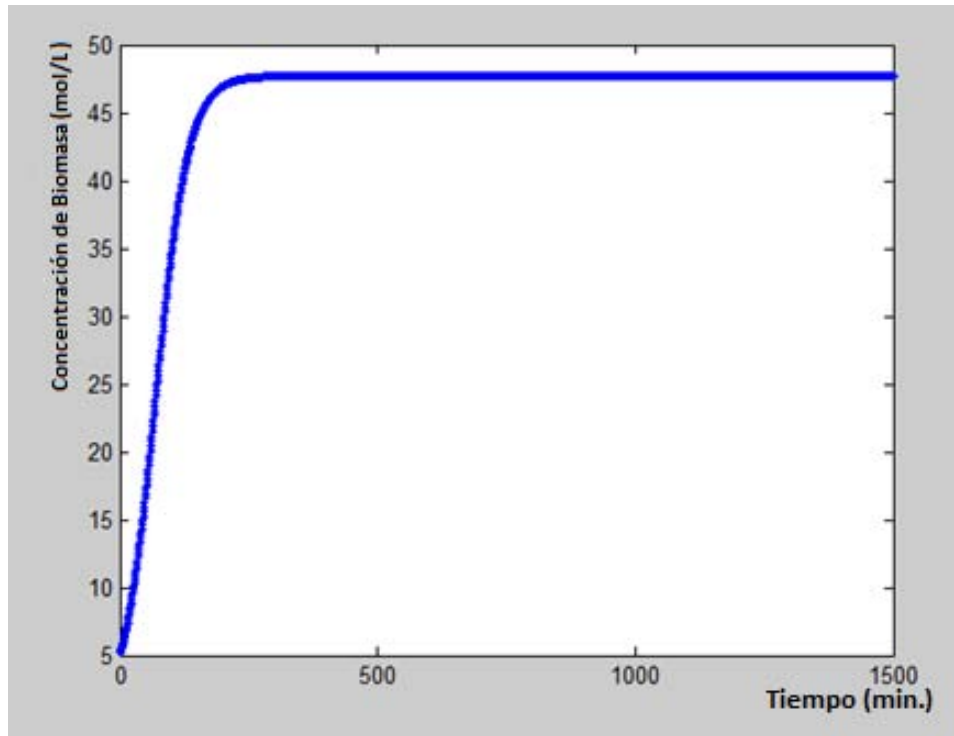


Figura 8: Gráfica de tiempo contra concentración de biomasa en biorreactor tipo batch.

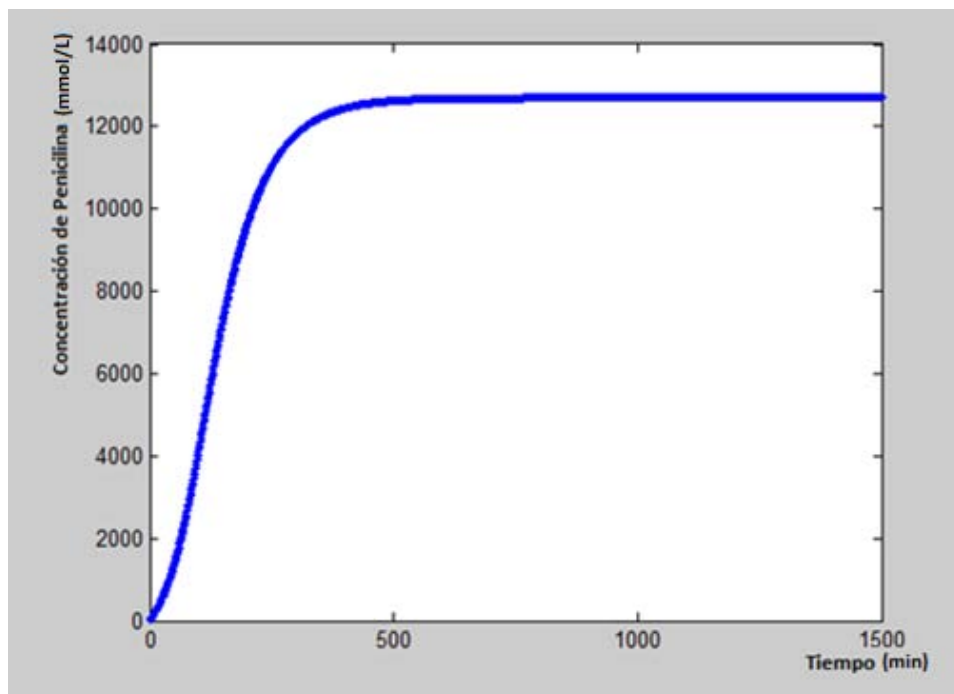


Figura 9: Gráfica de tiempo contra concentración de penicilina en biorreactor tipo batch.

En la figura 8 se puede observar la gráfica de tiempo contra concentración de biomasa en biorreactor tipo batch en donde al tiempo de 0 minutos, la concentración de biomasa es de 5 mol/L. creciendo poco a poco conforme pasa el tiempo hasta llegar a su concentración máxima de producto obtenido al tiempo de 225 minutos con una concentración de biomasa de 12500 mol/L. después de este tiempo ya no hay cambios en el sistema, es decir permanece constante.

De la misma forma, en la figura 9 se puede observar la gráfica de tiempo contra concentración de penicilina en biorreactor tipo batch en donde al tiempo de 0 minutos, la concentración de penicilina es de 0 mmol/L. creciendo poco a poco conforme pasa el tiempo hasta llegar a su concentración máxima de producto obtenido al tiempo de 300 minutos con una concentración de biomasa de 12500 mmol/L. después de este tiempo ya no hay cambios en el sistema, es decir permanece constante.

6.2 Biorreactor tipo CSTR

A continuación se realiza el análisis dinámico para el biorreactor de tipo CSTR, donde las ecuaciones son:

$$\frac{dy_1}{dt} = \frac{F}{V} y_{1F} + dt \left(k_1 y_1 - \frac{y_1}{k_2} \right) \quad 6.3$$

$$\frac{dy_2}{dt} = \frac{F}{V} y_{2F} + dt (k_3 y_1 - k_4 y_2) \quad 6.4$$

Donde:

$\frac{dy_1}{dt}$ =Evolución de la concentración de biomasa respecto el tiempo

$\frac{dy_2}{dt}$ =Evolución de la concentración de la penicilina

F = Flujo

V = Volumen

k1= constante

k2= constante

k_3 = constante

k_4 = constante

Posteriormente, se realizó el programa computacional para resolver las ecuaciones 6.3 y 6.4.

Utilizando el programa MATLAB

```
function penicilinalogcstr
clear all;close all; clc;
k1=0.0312; k2=47.7; k3=3.374; k4=0.01268;
y1=5; y2=0; dt=1; nit=500; F=1/500; V=1; y1F=2; y2F=0;
for t=1:nit
y1=y1+dt*k1*y1*(1-y1/k2)+F/V*y1F;
y2=y2+dt*(k3*y1-k4*y2)+F/V*y2F;
figure(1)
plot(t,y1,'. ');hold on;
figure (2)
plot (t,y2,'. ');hold on;
end
```

Las gráficas obtenidas son:

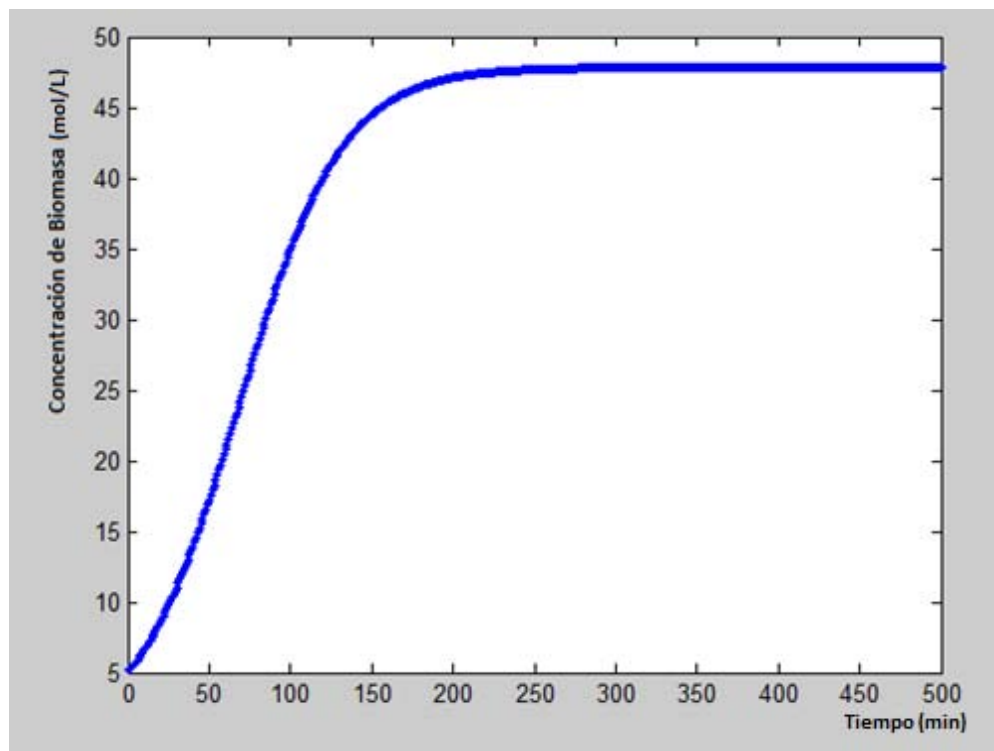


Figura 10: Gráfica de tiempo contra concentración de biomasa en biorreactor tipo CSTR.

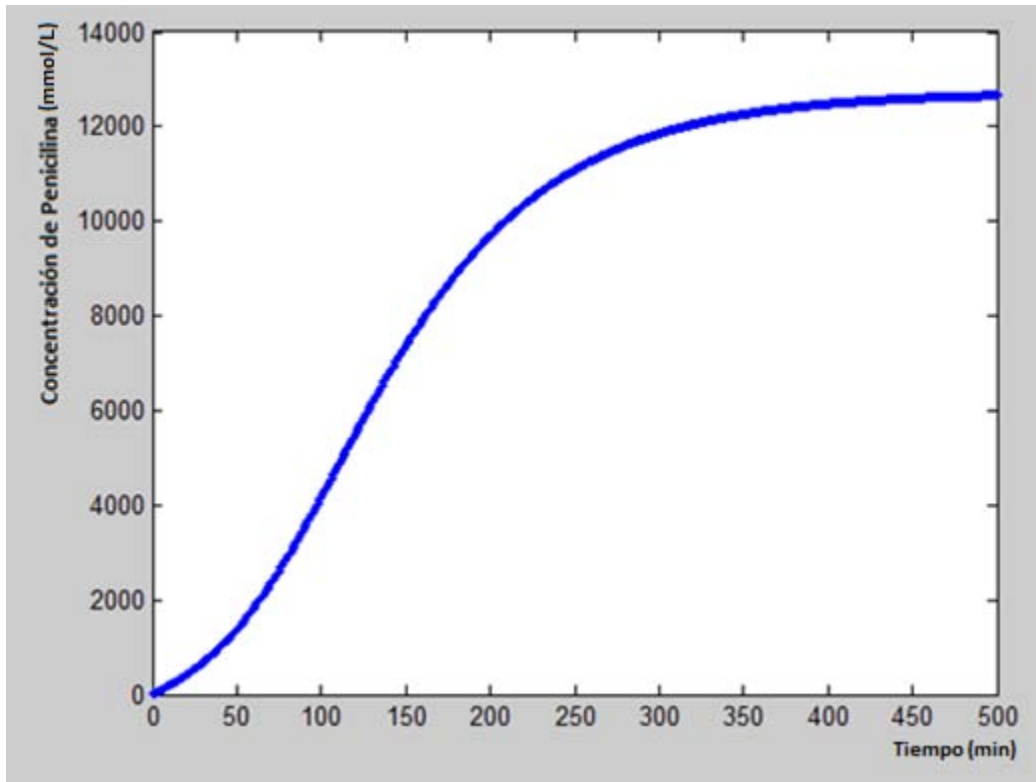


Figura 11: Gráfica de tiempo contra concentración de penicilina en biorreactor tipo CSTR.

En la figura 10 se puede observar la gráfica de tiempo contra concentración de biomasa en biorreactor tipo CSTR en donde al tiempo de 0 minutos, la concentración de biomasa es de 5 mol/L. creciendo poco a poco conforme pasa el tiempo hasta llegar a su concentración máxima de producto obtenido al tiempo de 275 minutos con una concentración de biomasa de 48 mol/L. después de este tiempo ya no hay cambios en el sistema, es decir permanece constante.

De la misma forma, en la figura 11 se puede observar la gráfica de tiempo contra concentración de penicilina en biorreactor tipo CSTR en donde al tiempo de 0 minutos, la concentración de penicilina es de 0 mmol/L. creciendo poco a poco conforme pasa el tiempo hasta llegar a su concentración máxima de producto obtenido al tiempo de 450 minutos con una concentración de biomasa de 12500 mmol/L. después de este tiempo ya no hay cambios en el sistema, es decir permanece constante.

6.3 Biorreactor tipo PFR

A continuación se realiza el análisis dinámico para el biorreactor de tipo CSTR, donde las ecuaciones son:

$$\frac{dy_1}{dt} = -v \frac{dC_A}{dz} + D \frac{d^2C_A}{dz^2} + k_1 y_1 - \frac{y_1}{k_2} \quad 7.5$$

$$\frac{dy_2}{dt} = -v \frac{dC_A}{dz} + D \frac{d^2C_A}{dz^2} + k_3 y_1 - k_4 y_2 \quad 7.6$$

Donde:

$\frac{dy_1}{dt}$ =Evolución de la concentración de biomasa respecto el tiempo

$\frac{dy_2}{dt}$ =Evolución de la concentración de la penicilina

v= velocidad

C_A= concentración de A

k₁= constante

k₂= constante

k₃= constante

k₄= constante

Posteriormente, se realizó el programa computacional para resolver las ecuaciones 7.5 y 7.6.

Utilizando el programa MATLAB

```
function penicilinalogpfr
clear all;close all;clc;
k1=0.0312; k2=47.70; k3=3.374; k4=0.01268; n=50;
y1(1:n)=0; y2(1:n)=0; dt=1; nit=2000; y1F=2; y2F=0;
vel=.1; D=1e-4;dz=1;
y1(1)=y1F;y2(1)=y2F;
for i=1:n;z(i)=(i-1)*dz;end
for t=1:nit
    for i=2:n-1
```

```

lapy1=(y1(i+1)-2*y1(i)+y1(i-1))/dz^2;
lapy2=(y2(i+1)-2*y2(i)+y2(i-1))/dz^2;
convy1=vel*(y1(i)-y1(i-1))/dz;
convy2=vel*(y2(i)-y2(i-1))/dz;
rq1=k1*y1(i)*(1-y1(i)/k2); rq2=k3*y1(i)-k4*y2(i);
y1(i)=y1(i)+dt*(D*lapy1-convy1+rq1);
y2(i)=y2(i)+dt*(D*lapy2-convy2+rq2);
end
y1(n)=y1(n-1);y2(n)=y2(n-1);
contar=t/100;
if (contar-ceil(contar))==0
figure (1)
plot (z,y1,'-');hold on;
figure(2)
plot (z,y2,'-r');hold on;
end
end

```

Las gráficas obtenidas son:

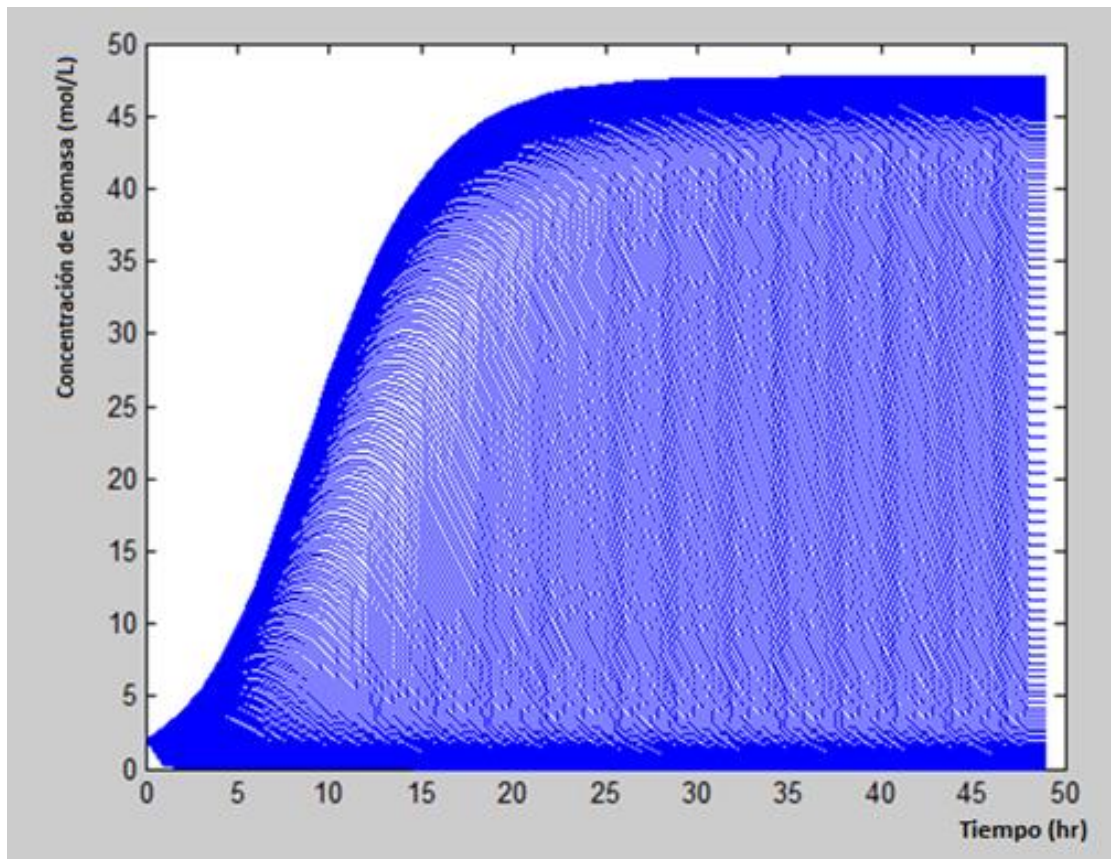


Figura 12: Gráfica de tiempo contra concentración de biomasa en biorreactor tipo PFR.

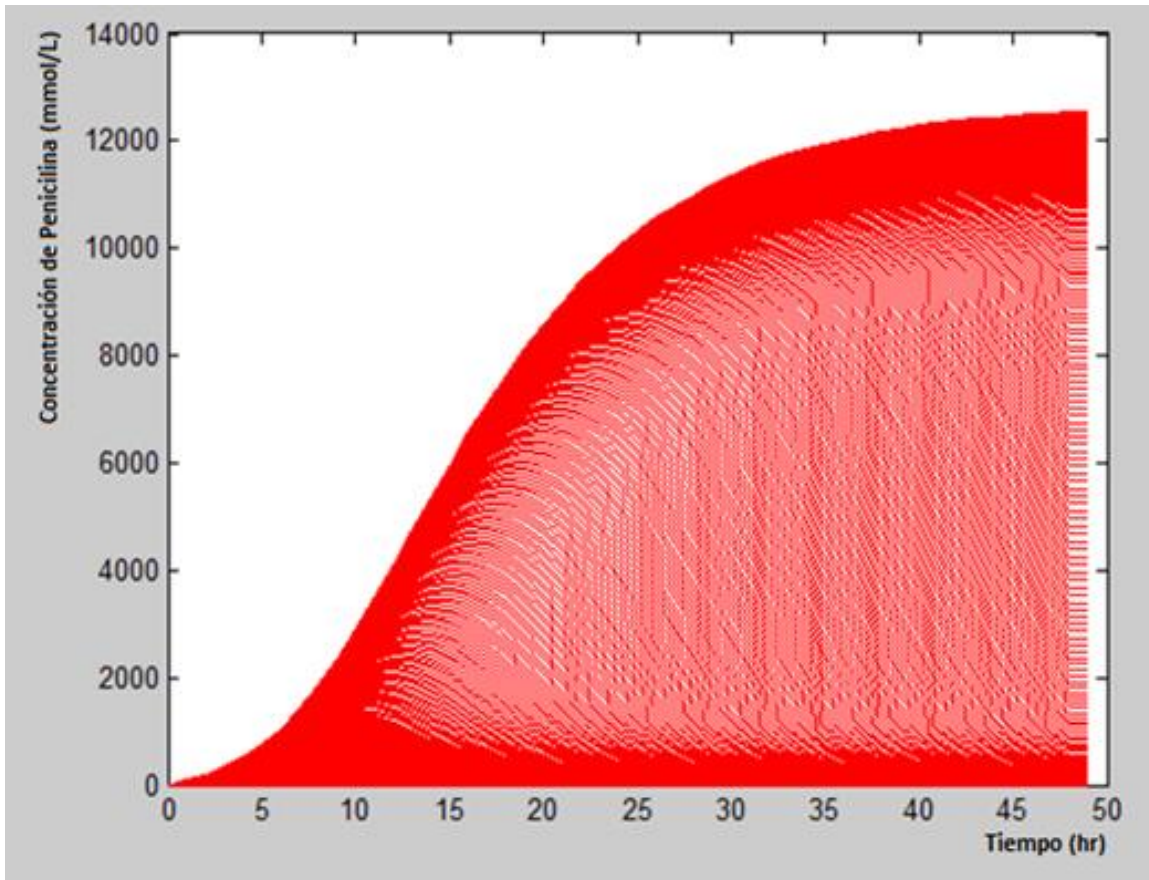


Figura 13: Gráfica de tiempo contra concentración de penicilina en biorreactor tipo PFR.

En la figura 12 se puede observar la gráfica de tiempo contra concentración de biomasa en biorreactor tipo PFR en donde al tiempo de 0 horas, la concentración de biomasa es de 2 mol/L. creciendo poco a poco conforme pasa el tiempo hasta llegar a su concentración máxima de producto obtenido al tiempo de 35 horas con una concentración de biomasa de 47 mol/L. después de este tiempo ya no hay cambios en el sistema, es decir permanece constante.

De la misma forma, en la figura 13 se puede observar la gráfica de tiempo contra concentración de penicilina en biorreactor tipo PFR en donde al tiempo de 0 horas, la concentración de penicilina es de 0 mmol/L creciendo poco a poco conforme pasa el tiempo hasta llegar a su concentración máxima de producto obtenido al tiempo de 45 horas con una concentración de biomasa de 12500 mmol/L, después de este tiempo ya no hay cambios en el sistema, es decir permanece constante.

CAPÍTULO 7.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS

BIORREACTORES

7.1 Ventajas

Algunas de las ventajas más importantes de los biorreactores son que en la industria se utilizan para realizar una gran cantidad de reacciones como son la síntesis de ésteres, amidas, lactonas, anhídridos, epóxidos y nitrilos, reacciones de óxido-reducción de alcanos, alquenos, alcoholes, cetonas, aldehídos, así como compuestos aromáticos, halogenaciones y deshalogenaciones, otro aspecto importante de los biorreactores son que al utilizar enzimas, estas pueden manipularse fácilmente, las reacciones que se efectúan, son de mayor especificidad, además de que no tienen tantas reacciones secundarias, las velocidades de reacción son más elevadas y eficientes, pueden trabajar a condiciones de operación de temperatura menor a los 100°C, y presión atmosférica, lo cual facilita la operación de los equipos e implican un bajo consumo energético, además de que las enzimas utilizadas en los biorreactores no generan contaminación, debido a que se pueden recuperar y son inocuas para el medio ambiente (CAR/PL, 2003).

Si se utilizan las enzimas en medios orgánicos, aumenta la solubilidad de las moléculas orgánicas, lo que aumenta la velocidad de reacción, se evita la contaminación microbiana, además de que se disminuye la desactivación enzimática por efecto de la temperatura, lo que quiere decir que son más resistentes a temperaturas elevadas.

Debido a que las enzimas utilizadas en los biorreactores son proteínas, son biodegradables.

7.2 Desventajas.

Las desventajas más comunes de utilizar un biorreactor, son que durante la utilización de las enzimas, estas muchas veces necesitan de coenzimas o mediadores para poder llevar a cabo la reacción, en un inicio, el costo de las enzimas es muy elevado, si se trabaja a temperaturas muy elevadas o valores extremos de pH, las enzimas se pueden degradar y por lo tanto no se lleva a cabo la reacción

CAPÍTULO 8.

**APLICACIONES DE LOS BIORREACTORES EN LA
INDUSTRIA QUÍMICA**

En la tabla 3 se muestran algunas de las aplicaciones de los diferentes tipos de biorreactores en la industria química.

Tabla 3. Aplicaciones de los biorreactores en la industria química.

TIPO DE BIORREACTOR	TIPO DE INDUSTRIA	APLICACIÓN
CSTR	Alimenticia.	Pan
PFR	Papelera	Revestimientos amiláceos
CSTR	Alimenticia.	Fabricación de Jarabe y Glucosa.
BATCH	Almidón	Almidón en frío de la ropa
PFR	Farmacéutica	Ayuda Digestiva. (Laxantes).
BATCH	Textil	Eliminación de Revestimientos
CSTR	Química	Eliminación de manchas. (Detergentes).
PFR	Limpieza en Seco	Limpieza de manchas
CSTR	Alimenticia.	Ablandador de Carne
BATCH	Farmacéutica.	Limpiador de Heridas.
PFR	Química.	Detergente domestico
CSTR	Alimenticia.	Relleno de Caramelos.
BATCH	Alimenticia.	Eliminación de Glucosa y Oxígeno.
PFR	Farmacéutica	Papeles indicadores de diabetes.
PFR	Alimenticia.	Bebidas Refrescantes (Jarabes de cereales ricos en glucosa).
BATCH	Alimenticia.	Prensado. (Clarificación de Vino).
PFR	Alimenticia.	Coagulación de leche (Quesos).
CSTR	Química	Suavizante y abrillantador de tejidos. (Detergentes).
PFR	Investigación Biológica y Forense.	Replicación del DNA por PRC.

CAPÍTULO 9.
CONCLUSIONES

Los biorreactores son equipos utilizados desde hace muchos, con la finalidad de ayudarnos a elaborar una gran cantidad de productos, los cuales son útiles para el ser humano, los biorreactores han sido elaborados con diferentes materiales y de diversos tamaños.

La clasificación de los biorreactores puede ser de diferentes maneras, ya sea por su diseño, la manera en la que se opera, o inclusive con base en su diseño, la manera en la que se opera o inclusive con base en el tipo de compuesto orgánico que utiliza. En la Industria se utiliza principalmente tres tipos de biorreactores, los biorreactores por lotes, los biorreactores de mezcla completa (CSTR), y los biorreactores de flujo pistón (PFR), debido a que estos tipos de biorreactores satisfacen las necesidades para elaborar los productos que utilizamos a diario.

En la elaboración, diseño y uso de un biorreactor, se necesita conocer la cinética de reacción, que puede ser gobernada por la ecuación de Michaelis-Menten, con o sin inhibición. Los parámetros cinéticos son necesarios para saber la velocidad de reacción y la concentración de la biomasa y el producto, además de que se encuentran ligados con la ecuación de Monod.

En el análisis, elaborado para la producción de la Penicilina, utilizando *Penicillium chrysogenum* como biomasa y apoyándonos del Programa MATLAB, pudimos observar que en las gráficas de las figuras 9, 11 y 13; la tendencia y comportamiento de cada uno de los biorreactores, demostrando que el biorreactor por lotes, es el más eficiente de los 3 modelos estudiados, debido a que alcanza una mayor cantidad de penicilina en menor tiempo, con respecto a los biorreactores del tipo CSTR y PFR, sin embargo, estos biorreactores son de procesamiento continuo y eso puede ser determinante para preferirlos.

También en las gráficas de las figuras 8, 10 y 12 se observó el comportamiento de la concentración de la biomasa con respecto el tiempo, donde se demostró que se obtuvo una mayor cantidad de biomasa en el biorreactor de tipo por lotes, que en los biorreactores de tipo CSTR y PFR.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Atkinson, B. *Reactores Bioquímicos*. Edit. Reverte. 1986. España
- 2- BDF. Ingredientes. Enzima Transglutaminasa. 2015 Recuperado el 30 de Junio de 2015 en: www.bdfingredients.com/es/ltransglutaminasa/probind_transglutaminasa.html?gclid=CNCNj7zWuMYCFY81aQodIFAJ8Q
- 3- Castillo, F. *Biotecnología Ambiental*. Edit. Tébar. 2005. España.
- 4- Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia (CAR/PL). *Aplicaciones de la Biotecnología en la Industria*. 2003. España.
- 5- Constantinides, A. *Numerical Methods for Chemical Engineers with MATLAB Applications*. Edit. Prentice Hall. 1990. Houston.
- 6- De Escalada, M. 2010. *Conceptos y Técnicas de Biotecnología I. Biorreactores*. Recuperado el 20 de Febrero de 2015 en: http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/biotec1/seminarios/Reactores%20biologicos%209-2010%20Marina.pdf/at_download/file.
- 7- Doran, P. *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Edit. Acribia. 1998. España.
- 8- European Food Information Council. EUFIC. 2002. *La Cerveza: Una Larga Historia*. Recuperado el 16 de Febrero de 2015 en: <http://www.eufic.org/jarticle/es/artid/cerveza/>.
- 9- Enríquez, J. 2012. *Productos de Microbiología Industrial*. Recuperado el 29 de Octubre de 2015 en: https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAAahUKEwjjssC11fzIAhWGgj4KHSRsCGI&url=http%3A%2F%2Fwww.unizar.es%2Fdepartamentos%2Fbioquimica_biologia%2Fdocencia%2FByMInd%2FDocumentos%2Fapoyo%2F01BMInd.ppt&usg=AFQjCNE_oShQxQWdAj4Aybg0ZhK4hpSLUg
- 10- Fogler, H. *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*. Edit. Prentice Hall. 2008. México.
- 11- Garay, R. 2013. *Glucosa Oxidasa-enzima de uso biotecnológico*. Recuperado el 26 de Junio de 2015 en: http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC34/3.html#.VZMkCRt_Oko

- 12- García, M. *Biotecnología Alimentaria*. Edit. Limusa. 1993. México.
- 13- Kent, A. *Kent and Riegel's Handbook of Industry and Biotechnology*. 2007. Massachusetts.
- 14- Lehninger, A. *Bioquímica*. Edit. Omega. 1985. Barcelona.
- 15- Marín, M. 2011. *Penicilina*. Recuperado el 16 de Febrero de 2015 en: http://www.ub.edu.ar/revistas_digitales/Ciencias/Vol12Numero1/Articulo_penicilina.pdf.
- 16- Rivas, C y Mota, M. 2008. *Bacterias anaerobias*. Recuperado el 17 de marzo de 2015 en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteriasAnaerobias.pdf>.
- 17- Scragg, A. *Biotecnología para Ingenieros*. Edit. Limusa. 1996. México.