



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**“Simulación computacional de la dinámica de reactores enzimáticos
y microbianos utilizando métodos numéricos tradicionales y
Autómatas Celulares en retículas de Boltzmann”**

TESIS

LICENCIATURA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Sustentante: Evangelina Sánchez Ramírez

Asesor: M. en C. Gilberto A. Amaya Ventura

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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

Simulación computacional de la dinámica de reactores enzimáticos y microbianos utilizando métodos numéricos tradicionales y autómatas celulares en retículas de Boltzmann.

Que presenta la pasante: **Evangelina Sánchez Ramírez**

Con número de cuenta: **089244887** para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

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 01 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	M. en C. Gilberto Atilano Amaya Ventura	
1er. SUPLENTE	Dr. Ricardo Paramont Hernández García	
2do. SUPLENTE	L.Ind. Mauro Isidoro Romero Acosta	

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

Dedicatorias:

Primeramente, a Dios, por tenerme siempre bajo su mirada y nunca dejarme sola, por mostrarme su amor infinito en todo momento y rodarme de tantas bendiciones en la vida, no tengo como pagar todo que soy y lo que tengo, me considero millonaria por las grandes personas que has puesto en mi camino, mil gracias señor.

También quiero dedicar esta tesis con todo mi amor, respeto, admiración y cariño, para los seres que me dieron la vida y me dieron el mejor ejemplo en la vida, distinguiéndose como personas buenas, honestas y trabajadoras, que lucharon por que me convirtiera en una persona de bien y me apoyaron en todo momento, a ustedes papas que me ven desde el cielo.

Gracias Mamá (Evangélica Ramírez Morales) y Papá (Alfredo Sánchez López), lo logramos este triunfo es de ustedes, espero se sientan orgullosos de mi como yo lo estaré siempre de ustedes, y espero que Dios me preste vida para compartir en algún momento lo mismo, pero con mi hijo (Sebastián Torres Sánchez), al cual considero mi motor, mi tesoro, mi razón de vivir y mi eterna alegría. Gracias mi chiquito por quererme tanto, aceptarme como soy, apoyarme en las buenas y en las malas y porque eres la persona que más me quiere, me conoce y me comprende.

Agradecimientos:

Quiero agradecer de forma respetuosa a la Universidad Autónoma de México, por haberme brindado la oportunidad de estudiar y pertenecer a ella; así mismo quiero agradecer a todos los maestros por mi formación, su esfuerzo, paciencia y tiempo, pero de una forma muy particular y con muchísimo cariño, respeto y admiración a mi amigo, maestro, y compañero de miles de aventuras al M. en C. Gilberto A. Amaya Ventura, por todo su apoyo, enseñanzas, consejos y cariño que siempre me ha brindado y que definitivamente, nunca lograré pagarle, a ti querido amiguito mil gracias.

También quiero agradecer a mis compañeros de carrera, los cuales me brindaron apoyo ayuda y consuelo en momentos difíciles, ellos son Norma Salazar (Chaparra), Jesús Morales (Chuchín), Marcos Gamaliel Tunalés Frías y Magalí Munivz, gracias queridos amigos,

Gracias a todas las personas que directa o indirectamente tuvieron que ver en la realización de este trabajo. Mil gracias Everardo Solano.

Y no por ser el último, sea el menos importante quiero agradecer a Juan Carlos, por querer compartir su vida conmigo.

Índice

	Página
Introducción	1
Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos Particulares	7
Capítulo 1 Generalidades	9
Resumen	9
1.1 Enzimas	9
1.2 Enzimas libres e Inmovilizadas	10
1.3 Métodos de inmovilización	11
1.3.1 Adsorción	12
1.3.2 Enlace covalente	13
1.3.3 Entrampamiento	14
1.3.4 Confinamiento en membrana	15
1.4 Tipos de Reactores	16
1.4.1 Reactor batch de tanque agitado , STR	16
1.4.2 Reactor de lecho empacado, PBR	17
1.4.3 Reactor de lecho fluidizado, FBR	18
1.4.4 Reactor de membrana, MR	20
1.5 Diseño de reactores enzimáticos	21
1.6 Selección de reactores enzimáticos	21
1.7 Reactores enzimáticos novedosos	22
1.8 Tipos de Biorreactores microbianos	24
Conclusiones del capítulo 1	25
Bibliografía	26
Capítulo 2 Cinética Enzimática y Biorreactores Batch	27
Resumen	27
2.1 Cinética de Michaelis-Menten	27
2.2 Biorreactores batch	28
2.2.1 Algoritmo de cómputo para la cinética de Michaelis-Menten en un biorreactor batch.	29
2.2.2 Resultados gráficos de la cinética de Michaelis-Menten en un biorreactor batch.	30
2.3 Simplificaciones del modelo cinético de Michaelis-Menten	31
2.4 Consideración de estado estacionario	32
2.5 Cinética de Michaelis-Menten para reacciones reversibles	35
2.6 Reactores batch enzimáticos con inhibición competitiva y no competitiva	37
2.6.1 Inhibidores	38
2.6.2 Modelo generalizado para el fenómeno de inhibición	38

2.6.3	Inhibición competitiva	39
2.6.4	Dinámica de un reactor enzimático batch con inhibición competitiva irreversible	42
2.6.5	Dinámica de un biorreactor batch con inhibición competitiva reversible	43
2.6.6	Inhibición por parte del producto	45
2.6.7	Inhibición no competitiva	46
2.6.8	Inhibición no competitiva reversible	48
2.7	Alosterismo y cooperatividad	50
	Bibliografía	52

Capítulo 3 Cinética Microbiana		53
Resumen		53
3.1	Crecimiento celular	53
3.1.1	Fundamentos de balance de materia en reacciones de crecimiento microbiano	54
3.1.2	Composición elemental de algunos microorganismos	55
3.2	Cálculos estequiométricos	55
3.3	Velocidad de crecimiento celular y rendimientos	56
3.4	Rendimiento entálpico	58
3.5	Factores que afectan la interacción de las células con el medio ambiente	58
3.6	Descripción cualitativa del crecimiento de la población celular	59
3.7	Fases de crecimiento celular discontinuo	61
3.7.1	Crecimiento exponencial	62
3.7.2	Fase estacionaria	63
3.7.3	Crecimiento diáuxico	67
3.7.4	Muerte celular	68
3.7.5	Modelos matemáticos para las fases de crecimiento exponencial y el estado estacionario	71
3.8	Modelo de Monod	72
3.8.1	Datos biográficos de Jacques Monod	72
3.8.2	Desarrollo del Modelo de Monod	72
3.8.3	Modificaciones al Modelo de Monod	75
3.9	Modelo matemático para el crecimiento diáuxico	77
3.9.1	Algoritmo computacional para el crecimiento diáuxico	79
3.10	Sistemas microbianos depredador-presa	83
3.10.1	Dos microbios y un solo sustrato	83
3.10.2	Algoritmo de cómputo	84
3.10.3	Resultados: Oscilaciones de todas las especies	84
3.11	Factores que afectan el crecimiento de la población celular	85
3.11.1	Influencia de la temperatura	85
3.11.2	Influencia del pH	88
3.12	Otros modelos cinéticos	89

Bibliografía	91
Capítulo 4 Reactores Enzimáticos	92
Resumen	92
4.1 Reactores ideales	93
4.1.1 Reactores batch de tanque agitado	94
4.1.2 Reactores de flujo en pistón, PFR	95
4.1.3 Reactores de flujo continuo de tanque agitado, CSTR	96
4.1.4 Comparación del comportamiento de reactores enzimáticos ideales	96
4.1.5 Optimización de arreglos de Biorreactores enzimáticos CSTR Y PFR en serie.	99
4.1.6 Biorreactores semibatch	100
4.2 Reactores enzimáticos no ideales	104
4.2.1 Solución de la ecuación de reacción-difusión-convección mediante análisis matemático	105
4.2.2 Método de Diferencias Finitas para la solución de la ecuación de reacción- difusión- convección	109
4.2.3 Método de Retículas de Boltzmann para la ecuación de reacción-difusión-convección	110
4.2.4 Comparación entre la solución analítica y las soluciones numéricas para un reactor enzimático tubular	113
4.3 Reactor de lecho fijo con enzima inmovilizada en una matriz sólida esférica.	116
4.3.1 Soluciones Analíticas.	116
4.3.1.1 Cinética de orden cero	118
4.3.1.2 Cinética de primer orden	121
4.3.2 Transporte transitorio de masa al interior de una esfera	123
4.3.2.1 Solución analítica	124
4.3.2.2 Aproximación por diferencias finitas	125
4.3.2.3 Modelo de Autómatas Celulares en Retículas de Boltzmann	125
4.3.3 Modelo de retículas de Boltzmann para difusión con reacción enzimática	132
Bibliografía	135
Capítulo 5. Dinámica de Biorreactores Microbianos	136
Resumen	136
5.1 Reactores de flujo en pistón para crecimiento microbiano en estado estacionario	136
5.2 Fermentador de glucosa con <i>Zymmomonas mobilis</i> .	139
5.3 Cinética para la fermentación de glucosa con <i>Zymmomonas mobilis</i> .	142
5.4 Dinámica de un fermentador CSTR, utilizando <i>Zymmomonas mobilis</i> .	142

5.4.1	Algoritmo computacional	143
5.4.2	Resultados	144
5.4.3	Optimización de las condiciones de operación del reactor CSTR.	147
5.5	Reactor microbiano de membrana con células inmovilizadas	150
5.5.1	Perfiles de velocidad en el biorreactor de membrana	151
5.5.2	Modelo matemático para el biorreactor de membrana	153
5.5.3	Algoritmo computacional para el biorreactor de membrana	153
5.5.4	Resultados para el reactor de membrana	158
	Bibliografía	162
	Conclusiones	163
	Bibliografía General	165

Glosario:

- **Biorreactor batch:** en español biorreactor intermitente. Es un tipo de reactor que se alimenta con lotes de sustratos y que contiene catalizadores biológicos, ya sea enzimas o microorganismos. Se espera a que progrese la reacción un determinado tiempo y en ese momento se descarga la mezcla de productos y reactivos sin reaccionar, para llevarlos a procesos de separación.
- **Biorreactor CSTR:** Continuous stirred tank reactor). en español reactor de flujo continuo de tanque agitado. A este tipo de equipos se le alimenta continuamente una corriente de sustrato y se extrae el producto de manera continua, casi siempre bajo el mismo flujo volumétrico, para mantener invariante el volumen de la mezcla dentro del reactor. En la modelación matemática de este tipo de biorreactores se supone que la mezcla reaccionante dentro de él se encuentra perfectamente mezclada, con composición homogénea. Sin embargo en la realidad el CSTR suele presentar no idealidades hidrodinámicas y difusionales.
- **Biorreactor PFR (Plug flow reactor):** biorreactor de flujo en pistón: es un modelo idealizado de un reactor de flujo continuo, en el que se hipotetiza que la mezcla reaccionante avanza a lo largo del reactor con un frente de reacción de composición homogénea, es decir, sin barreras para la dispersión radial. La situación real que mejor se adapta a este tipo de reactor es el de flujo turbulento plenamente desarrollado a través de un tubo que comúnmente es enrollado en forma de serpentín.
- **Biorreactores de membrana, MB:** son equipos en los que se utiliza una membrana donde se inmovilizan enzimas o microorganismos para llevar a cabo la reacción. El fluido reaccionante atraviesa la membrana llevándose a cabo la conversión de sustratos en productos y su separación simultáneamente. Su modelación matemática es desafiante.
- **Biorreactor STR (stirred tank reactor):** Biorreactor de tanque agitado. Puede operar de forma continua (CSTR) o por lotes (BSTR).
- **Biorreactor BSTR (batch stirred tank reactor):** Bioreactor intermitente de tanque agitado. Es la contraparte real del reactor batch ideal. Es decir, también pueden existir no idealidades hidrodinámicas y difusionales durante la agitación del contenido del biorreactor.
- **Biorreactor CSTR/UF:** (Continuous stirred tank reactor with ultrafiltration). Es un biorreactor continuo de tanque agitado con una membrana que permite separar la enzima a la salida del equipo para recircularla.
- **Biorreactor PBR (Packed bed reactor):** es un reactor de lecho empacado, con la enzima o microorganismos inmovilizados dentro del empaque.
- **Biorreactor FBR (Fluidized bed reactor).** Es un tipo de reactor en el que se optimiza la superficie de contacto entre el sustrato y el catalizador biológico. Mediante una corriente de fluido se pone en movimiento la fase sólida, frecuentemente en forma vertical, pero también se puede fluidizar horizontalmente.

Índice de Figuras

Introducción

- Fig. 1 Modelos matemáticos de reactores batch y CSTR operando en régimen transitorio y métodos de solución de las ecuaciones diferenciales resultantes. 2
- Fig. 2 Modelos matemáticos para Biorreactores Batch y CSTR con control operando en régimen transitorio, especificando los métodos de solución. 3

Capítulo 1

- Fig. 1.1 Diferentes métodos de inmovilización de enzimas. 12
- Fig.1.2 Diferentes tipos de Biorreactores enzimáticos. 18
- Fig.1.3 Biorreactor de membrana de enzima inmovilizada. 23
- Fig. 1.4 Diferentes tipos de microbioreactores. 23
- Fig. 1.5 Fermentadores de Lecho Fluidizado. 24
- Fig. 1.6 Diferentes tipos de fermentadores standard. 25

Capítulo 2

- Fig. 2.1. Representación esquemática de un biorreactor batch con reacción en fase homogénea. 28
- Fig. 2.2 Evolución de la concentración de las diferentes especies dentro de un reactor batch perfectamente agitado para cinética de Michaelis- Menten. 30
- Fig.2.3 Método para determinación de la constante de Michaelis a partir de la velocidad máxima en un reacción con cinética de Michaelis-Menten. 33
- Fig. 2.4 Gráfica que permite comprobar si una reacción enzimática sigue la cinética de Michaelis-Mente. 34
- Fig. 2.5 Evolución de la concentración de todas las especies para cinética de Michaelis-Menten con paso reversible en la disociación del complejo enzima-substrato. 37
- Fig.2.6 Esquema Generalizado de Inhibición Enzimática 38
- Fig. 2.7 Tipos de inhibición 39
- Fig. 2.8 Inhibición Competitiva. Efecto de la concentración del inhibidor sobre la rapidez de reacción. 41
- Fig.2.9 Evolución de concentración de sustrato y producto en un reactor Batch para inhibición competitiva irreversible. 43
- Fig. 2.10 Evolución de las concentraciones de sustrato y producto en un reactor Batch para reacción competitiva reversible 44
- Fig. 2.11 Variación de las concentraciones de Sustrato y Producto dentro de un reactor Batch para reacciones enzimáticas con inhibición por parte del producto 46
- Fig. 2.12 Evolución de las concentraciones de Sustrato y Producto para Inhibición no competitiva dentro de un reactor Batch 47
- Fig. 2.13 Evolución de las concentraciones de Sustrato y Producto para Inhibición no competitiva reversible dentro de un reactor Batch 50
- Fig. 2.14 Gráficas de velocidad de reacción vs [ligando] para cooperatividad positiva, no cooperatividad y cooperatividad negativa. 51

Capítulo 3

Fig. 3.1	Etapas de crecimiento de la población microbiana	54
Fig. 3.2	Interacción célula-medio ambiente	59
Fig. 3.3	Aproximaciones a la Cinética Microbiana	60
Fig. 3.4	Etapas de crecimiento celular	61
Fig. 3.5	Diagrama de la Ley de Maltus	63
Fig. 3.6	Gráfica de la etapa estacionaria en el crecimiento de la población microbiana a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.	63
Fig. 3.7	Rapidez de crecimiento exponencial microbiano por consumo de sustrato	65
Fig. 3.8	Dependencia de la población máxima de microbios con respecto a la concentración inicial de nutriente limitante.	66
Fig. 3.9	Fases de crecimiento exponencial y estado estacionario cuando se acumulan materiales tóxicos.	66
Fig. 3.10	Gráfica de la fase estacionaria	67
Fig. 3.11.	Crecimiento diáuxico de la Escherichia Coli	68
Fig. 3.12	Gráfica del periodo de muerte celular	69
Fig.3.13	Gráfica de simulación computacional de las etapas de crecimiento microbiano.	70
Fig.3.14	Evolución de las concentraciones de sustratos durante el crecimiento diáxico.	81
Fig.3.15	Evolución de la concentración de microorganismos durante el crecimiento diauxico.	82
Fig.3.16	Gráfica de la concentración de las enzimas clave durante el crecimiento diáuxico.	82
Fig.3.17	Evolución de la concentración de las cuatro especies dentro de un biorreactor CSTR.	85
Fig.3.18	Clasificación de las bacterias en función del intervalo de temperatura que favorece su metabolismo y crecimiento.	87
Fig.3.19	Efecto de la temperatura en el crecimiento de E. Coli.	87
Fig.3.20	Clasificación de los mrcroorganismos según su tolerancia al pH.	89

Capítulo 4

Fig. 4.1.	Representación esquemática de los diferentes tipos de Reactores Ideales	93
Fig. 4.2.	Gráfica comparativa de los tiempos de residencia en reactores CSTR y PFR, para cinética de primer orden.	97
Fig. 4.3	Gráfica comparativa de tiempos de residencia en reactores CSTR y PFR, para cinética de Michaelis-Menten.	99
Fig. 4.4	Diagrama del recíproco de la rapidez de reacción contra la conversión, para condiciones de estado estacionario. El área bajo la curva corresponde al volumen del reactor.	99
Fig. 4.5	Diagrama del recíproco de la rapidez de reacción contra conversión para reactores PFR y CSTR	100
Fig. 4.6	Evolución de las concentraciones de sustrato y producto en un reactor semibatch para cinética de Michaelis-Menten.	103
Fig. 4.7	Discretización del espacio unidimensional y estencil unitario para	111

	los autómatas celulares en redes de Boltzmann.	
Fig. 4.8	Distribuciones Precolisional y Postcolisional del número de partículas en los autómatas celulares de redes de Boltzmann.	112
Fig. 4.9.	Comparación entre la solución analítica y dos aproximaciones numéricas para la ecuación de reacción-difusión-convección en coordenadas cartesianas	115
Fig. 4.10.	Biorreactor de lecho empacado con enzima inmovilizada en el interior de pellets esféricos, con mecanismos de transporte y reacción que ocurren en su interior.	117
Fig. 4.11	Representación esquemática de un pellet esférico y sistemas de coordenadas a emplear, junto con las condiciones de frontera	118
Fig. 4.12	Representación Gráfica de la concentración adimensional de sustrato y de producto en función de la coordenada radial adimensional, dentro de un pellet esférico, a diferentes valores del modulo de Thiele para una reacción de orden cero.	121
Fig. 4.13	Representación Gráfica de la concentración adimensional de sustrato y de producto en función de la coordenada radial adimensional, dentro de un pellet esférico, a diferentes valores del modulo de Thiele para una reacción de primer orden.	123
Fig. 4.14	Esténcil unitario para el método numérico de diferencias finitas aplicado a la difusión molecular en el pellet esférico	125
Fig. 4.15	Esténcil unitario para el método de retículas de Boltzmann para difusión molecular en coordenadas esféricas	126
Fig. 4.16	Diagrama de flujo para el algoritmo de redes de Boltzmann	128
Fig. 4.17	Comparación entre la solución analítica (exacta) y las aproximaciones numéricas por diferencias finitas y redes de Boltzmann. Obsérvese la gran exactitud del autómata celular	131
Fig. 4.18	Resultados de la simulación de la reacción enzimática tipo Michaelis-Menten llevándose a cabo en el interior de un pellet esférico. El resultado más confiable es el de redes de Boltzmann.	134

Capítulo 5

Fig. 5.1	Representación esquemática del biorreactor de flujo continuo de mezcla completa.	140
Fig. 5.2	Oscilaciones Sostenidas (de amplitud invariante) dentro del fermentador de glucosa con <i>Zymomonas Mobilis</i> .	144
Fig. 5.3	Ruta del sistema dinámico en su trayectoria hacia el ciclo límite en el diagrama de espacio-fase, y proyecciones en gráficas bidimensionales	145
Fig. 5.3	Oscilaciones sostenidas y amortiguadas, obtenidas al operar el fermentador con <i>Z. mobilis</i> bajo diferentes relaciones de dilución	145
Fig. 5.4	Grafica de concentración de producto a la salida del biorreactor CSTR, a diferentes rapidezces de dilución.	147
Fig. 5.5	Gráfica de productividad contra rapidez de dilución.	148
Fig. 5.6	Máximo maximorum de la concentración del producto	148
Fig. 5.7	Conclusiones respecto a la optimización del reactor	149
Fig. 5.8	Biorreactor de membrana	151
Fig. 5.9	Perfiles de velocidad para las regiones anular y central del Biorreactor de membrana de enzima inmovilizada.	154

- Fig. 5.10 Perfiles de concentración de sustrato, producto, microbios y enzima E después de 7 hrs, de operación del biorreactor de membrana de células inmovilizadas. Concentración de sustrato en la entrada =120 gr/litro; de producto =50 gramos/litro, de *Zymomonas* =7 gr/litro y de especie E=1 x 10⁻⁵. 158
- Fig. 5.11 Evolución de los perfiles de concentración de cada una de las especies dentro del biorreactor de membrana 159
- Fig. 5.12 Evolución de la concentración de cada una de las especies a la salida del reactor 160

Índice de Tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1	Clasificación internacional de enzimas	10
-----------	--	----

Capítulo 3

Tabla 3.1	Ejemplos de microorganismos utilizados en la industria de alimentos.	55
Tabla 3.2	Definición y símbolos de coeficientes estequiométricos	57
Tabla 3.3	Coefficientes estequiométricos para el rendimiento bacteriano con diferentes sustratos.	57
Tabla 3.4	Clasificación de microorganismos de acuerdo a su comportamiento térmico.	86
Tabla 3.5	Otros modelos cinéticos	90
Tabla 3.6	Cinéticas que tienen en cuenta la inhibición por sustrato.	90
Tabla 3.7	Cinéticas que tienen en cuenta la inhibición por parte del producto.	90

Capítulo 4

Tabla 4.1	Expresiones cinéticas y tiempos de residencia en Biorreactores enzimáticos batch operando en régimen estacionario	95
Tabla 4.2	Modelos cinéticos con inhibición por parte del sustrato e inhibición competitiva por parte del producto y tiempos de residencia correspondientes.	96

Capítulo 5

Tabla 5.1	Propiedades y condiciones de operación para fermentaciones con <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	141
-----------	---	-----

Introducción

El diseño en bioingeniería no solo consiste en la aplicación de conceptos básicos que permitan obtener un prototipo de reactor. Para lograr un modelo novedoso el ingeniero en alimentos debe utilizar su creatividad y el ingenio propio, que permitan conjuntar el ambiente biológico de un cultivo vivo con el ambiente artificial de un dispositivo controlado; a dicho modelo se le denomina biorreactor o reactor biológico.

Un biorreactor, como dispositivo biotecnológico, debe proveer el ambiente biológico adecuado para garantizar el crecimiento de los microorganismos o enzimas, y maximizar la producción. El ingeniero debe suministrar los controles necesarios para que la operación o proceso se lleve a cabo con economía, y en el menor tiempo posible.

Los reactores biológicos, a diferencia de los químicos, poseen una cinética que no queda determinada exclusivamente por la velocidad de reacción y las variables que influyen en ella, sino que también depende de las características intrínsecas del microorganismo, tales como crecimiento y división celular, así como el tipo de operación que se lleve a cabo. Por eso lo primero que se especifica en el diseño de un biorreactor es el propósito de utilización, es decir el tipo de cultivo que se va a emplear, la manera de operar y el procedimiento de cultivo.

En la medida de lo posible, el conjunto biorreactor–medio de cultivo debe cumplir con las siguientes características:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el medio de cultivo
- Mantener la temperatura constante y homogénea
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes (sustrato)
- Impedir la sedimentación y la floculación
- Permitir la difusión de oxígeno en el caso de reacciones aeróbicas
- Mantener el cultivo puro
- Mantener un ambiente aséptico.

Cabe mencionar que la ingeniería de los biorreactores enzimáticos y microbianos es una de las tareas más específicas de un ingeniero en alimentos. En ella se utilizan varios elementos de la formación profesional del estudiante de esta carrera. Se aplican balances de materia y energía infinitesimales, flujo de fluidos, transferencia de masa con reacción química y algunos tópicos de optimización de procesos. Las ecuaciones diferenciales que gobiernan el comportamiento de un Biorreactor pueden ser resueltas analíticamente solo para casos muy particulares, teniéndose que recurrir comúnmente a métodos numéricos.

Cuando se diseñan biorreactores batch (intermitentes) y CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor, reactores continuos de tanque agitado), las ecuaciones diferenciales gobernantes son ecuaciones ordinarias no lineales, debido a que involucran cinéticas tipo Michaelis-Menten o Monod. Dichas ecuaciones pueden ser resueltas mediante

métodos analíticos o numéricos. Comúnmente la solución analítica involucra una separación de variables e integración directa, aunque en algunas ocasiones es necesario utilizar una transformada de Laplace. En los casos no integrables, se utilizan métodos de Euler y Runge-Kutta, cuyo fundamento matemático corresponde a la aplicación del teorema de L'Hopital o aproximaciones en serie de Taylor de la derivada. Algunos de los casos que se trabajan en esta tesis corresponden a la aplicación de dichos métodos. La siguiente figura es una representación esquemática de la forma en que se aborda la descripción de la dinámica de este tipo de biorreactores operando en régimen transitorio.

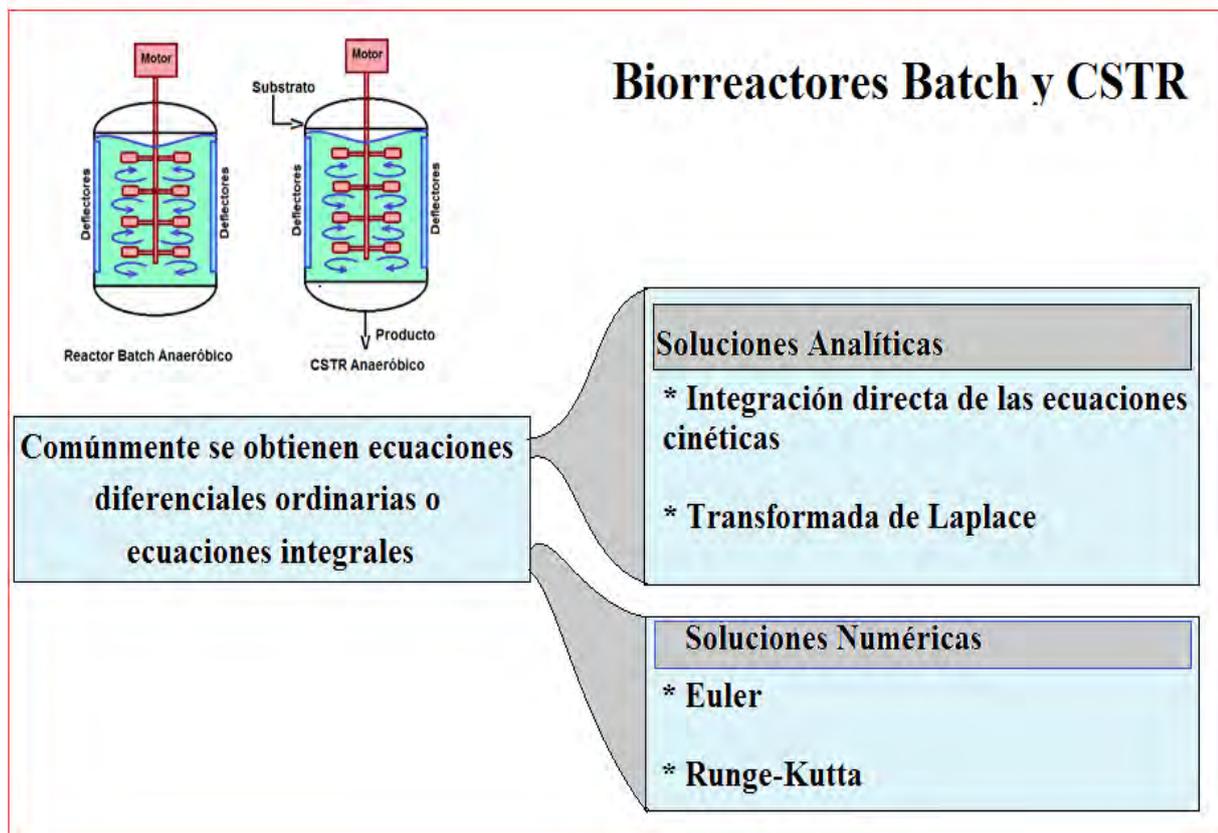


Figura 1. Modelos Matemáticos de reactores batch y CSTR operando en régimen transitorio y métodos de solución de las ecuaciones diferenciales resultantes

Cuando se describe matemáticamente la dinámica de biorreactores CSTR o Batch con sistemas de control de temperatura o de flujo, para maximizar el rendimiento, el análisis matemático conduce a ecuaciones integro-diferenciales. Dichas ecuaciones pueden ser resueltas analíticamente para una pequeña cantidad de casos. El procedimiento consiste en aplicar el operador derivada a toda la ecuación y convertirla en una ecuación diferencial ordinaria de orden superior, eliminando la parte integral de la expresión matemática. Numéricamente se pueden trabajar por separado los operadores derivada e integral, el primero con el esquema del L'Hopital y el segundo como una suma acumulada en el tiempo. En este trabajo de tesis no se abordó

ningún reactor CSTR con control, debido a que se resolvieron otro tipo de problemas también de interés.

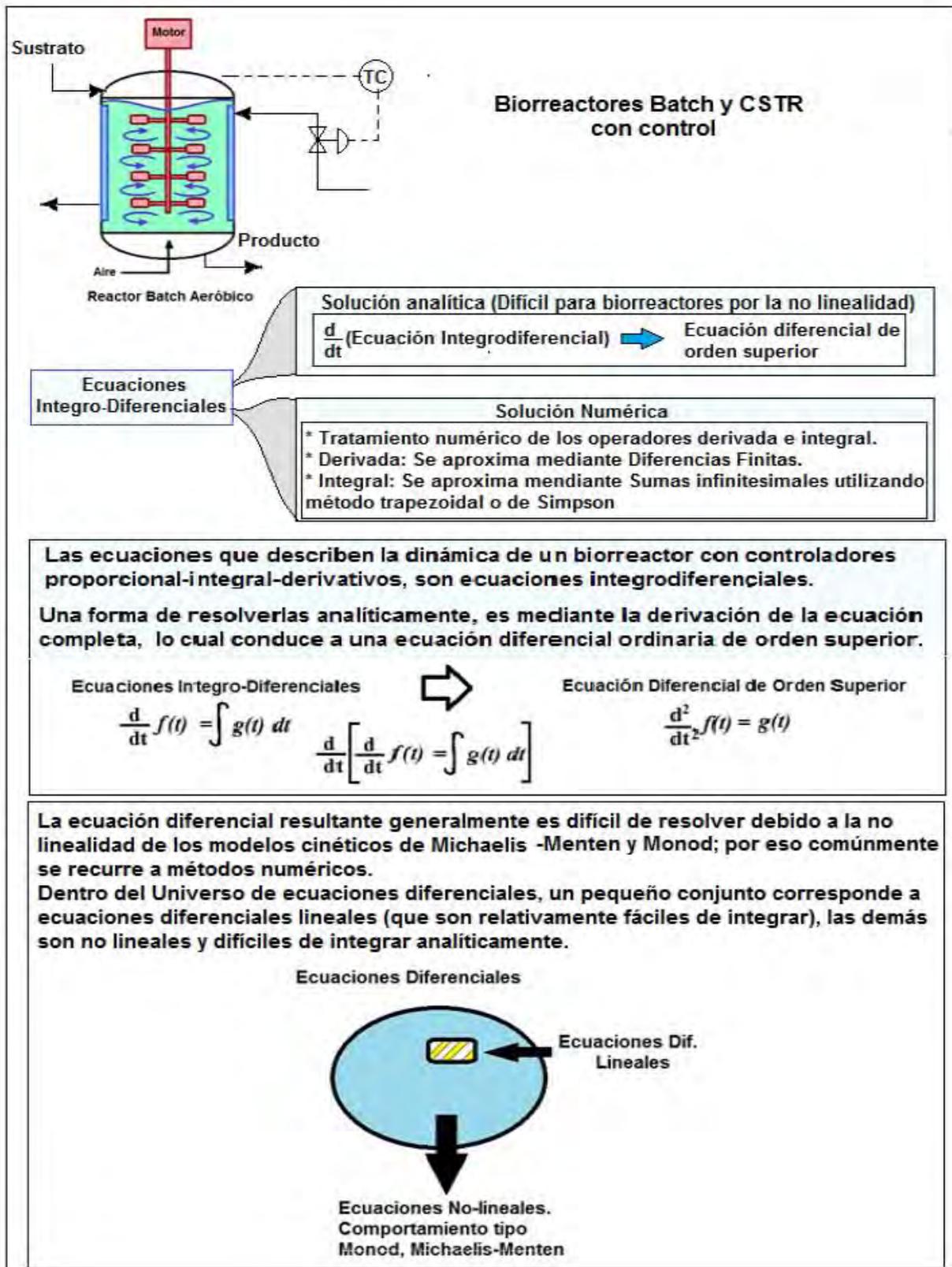


Figura 2. Modelos matemáticos para Biorreactores Batch y CSTR con control operando en régimen transitorio, especificando los métodos de solución.

Como ejemplos de algunos casos en que es factible obtener la solución exacta mediante análisis matemático, en esta tesis se presentan algunos desarrollos propios correspondientes a:

- (1) la integración por fracciones parciales de una ecuación diferencial ordinaria, aplicada a la dinámica de crecimiento de la población bacteriana en procesos de fermentación.
- (2) la solución mediante series de Fourier de una ecuación diferencial parcial aplicada al diseño de Biorreactores tubulares de flujo en pistón.
- (3) La solución de la ecuación de difusión transitoria, aplicable a pellets esféricos de enzimas inmovilizadas.

Las soluciones exactas sirven como parámetro de comparación para evaluar el grado de exactitud de las aproximaciones numéricas.

Entre los métodos numéricos que comúnmente se utilizan para el diseño y optimización de Biorreactores, se tienen los siguientes:

- Los métodos de Euler y Runge-Kutta, para la resolución de las ecuaciones diferenciales ordinarias que gobiernan el comportamiento dinámico de reactores batch, semibatch y CSTR; ambos se basan en el teorema de L'Hopital de la definición de la derivada a partir de un límite.
- Los métodos clásicos de diferencias finitas y elementos finitos, para el diseño de Biorreactores de flujo en pistón y biorreactores de membrana.
- Métodos modernos basados en autómatas celulares en redes de Boltzmann, proveniente de la teoría cinética de la mecánica estadística.

Una de las principales aportaciones de este trabajo es la introducción de este último método, a la ingeniería de biorreactores enzimáticos y microbianos.

La dinámica de los biorreactores no ideales, donde la difusión o la presencia de fenómenos hidrodinámicos complejos son importantes, se describe mediante ecuaciones diferenciales parciales, de reacción-difusión-convección. En estos casos es necesario conocer el perfil de velocidades del fluido resolviendo la ecuación de Navier Stokes. Ya obtenido dicho perfil, la ecuación de reacción-difusión-convección puede ser resuelta analíticamente o numéricamente. En este trabajo se presentan algunas soluciones analíticas para casos integrables, haciendo uso de series de Fourier, aunque otra opción son las transformadas de Laplace. Dicha solución sirve como referencia para comparar la exactitud de las aproximaciones numéricas. Los métodos numéricos tradicionales que se aplican en el diseño de biorreactores son: Diferencias Finitas, Elementos Finitos, Volúmenes Finitos, etc., existiendo actualmente software comercial que hace uso de ellos. Sin embargo, en este trabajo se presentan algoritmos propios los cuales son aportación importante de esta tesis, pero además se utilizó un método más moderno basado en la teoría cinética molecular que corresponde al denominado Autómatas Celulares en Redes de

Boltzmann, que presenta las siguientes ventajas, por las cuales se decidió utilizarlo en esta tesis:

- ❖ Gran exactitud, debido a su profundo fundamento físico basado en principios de conservación de masa, momentum y energía durante las colisiones entre partículas ficticias.
- ❖ Formulación local que toma en cuenta interacciones globales, dando lugar a un método explícito fácil de programar y de ejecución rápida.
- ❖ Flexibilidad para cambiar condiciones de frontera y geometría.

El método de Elementos Finitos es con el que se formula la mayoría de los paquetes de software comercial. Pero requiere dedicarle un largo tiempo para programarlos y ejecutarlos, pues se trata de un método implícito en el que se requiere armar un sistema de ecuaciones simultáneo no lineal y luego resolverlo para cada paso de tiempo; esto da lugar a tiempos de ejecución veinte o más veces mayor que el que se requiere con una Red de Boltzmann.

Para la programación de un método de Elementos Finitos (colocación ortogonal, mínimos cuadrados, Galerkin o variacional) es necesario especificar la topología, indicando las interconexiones nodo-nodo y elemento-elemento, así como la identificación de elementos internos, elementos frontera y elementos esquina. La especificación de esta topología le da flexibilidad al método, dando como resultado que un solo programa puede servir para diferentes geometrías con el simple cambio de las coordenadas nodales. Un programa bien hecho, al modificar las coordenadas nodales, reconstruye automáticamente todas las ecuaciones de Elementos Finitos y las resuelve. Algo parecido ocurre con la Red de Boltzmann y no con Diferencias Finitas, donde siempre es necesario volver a programar.

Los autómatas celulares en retículas de Boltzmann fueron formulados en 1989 específicamente para resolver problemas de hidrodinámica compleja, tales como inestabilidades hidrodinámicas, flujo sobre geometrías irregulares, etc.; en esta tesis se utilizan estos autómatas para resolver la ecuación de difusión con reacción química y la ecuación de reacción-difusión-convección, aplicadas a la descripción de la dinámica de biorreactores enzimáticos y microbianos; considerando la velocidad del fluido como constante, es decir, sin resolver la ecuación de Navier-Stokes. Uno de los trabajos en los que se evaluaron campos de velocidad sobre obstáculos de geometría irregular, fue presentado por los autores de esta tesis en septiembre de 2016, correspondiente al diseño de biorreactores de enzima inmovilizada para la producción de biodiesel a partir de aceite de palma, resolviendo la ecuación de Navier-Stokes para calcular el campo de velocidad del flujo del reactivo en fase líquida a través del lecho fijo de enzima; sin embargo dicho trabajo no se incluye aquí.

La estructura de este trabajo de tesis profesional es la siguiente:

En el capítulo uno se describe la forma en que operan los diferentes modelos de biorreactores que han sido diseñados a lo largo de más de cien años del desarrollo de

procesos biotecnológicos industriales. Además, se especifican las técnicas modernas de inmovilización de enzimas y células; conceptos importantes para el diseño de fermentadores y reactores enzimáticos que se analizan en capítulos posteriores.

En el capítulo dos, se describen las características importantes de la cinética enzimática, incluyendo el modelo clásico de Michaelis-Menten y los efectos de inhibición de la actividad enzimática por parte de sustrato y producto; formulando los modelos matemáticos correspondientes y escribiendo algoritmos de cómputo para la simulación de dicha cinética en reactores batch.

El tercer capítulo trata de la descripción de la dinámica de la población microbiana durante procesos de fermentación; llevándose a cabo el análisis de las diferentes fases de crecimiento, incluyendo el periodo de latencia, el crecimiento exponencial, la fase estacionaria y el periodo de muerte. Igualmente se formulan los modelos matemáticos correspondientes y los algoritmos de cómputo para fermentaciones en Biorreactores batch. Se presentan también algoritmos computacionales propios para el fenómeno del crecimiento diáuxico y para un sistema depredador-presa.

En el cuarto capítulo se analiza la dinámica de biorreactores ideales. Se comienza con biorreactores enzimáticos tipo CSTR (tanque agitado con flujo continuo), tomando como ejemplo algunos casos reportados en la literatura científica. En segundo lugar se analiza el comportamiento de biorreactores tipo PFR (Plug Flow Reactor, flujo en pistón) operando en condiciones de estado estacionario; y luego se describe cómo se puede optimizar, gráficamente, un arreglo de dos biorreactores CSTR y PFR en serie, operando en régimen permanente. Después se formula un algoritmo computacional para la operación de un reactor semibatch. Luego, para considerar la operación de un biorreactor tubular ideal en régimen transitorio, se presenta la solución analítica, mediante series de Fourier, de la ecuación de reacción-difusión-convección, que gobierna la dinámica de biorreactores de tipo flujo en pistón con dispersión axial, siendo ésta una de las contribuciones importantes de esta tesis. Al mismo tiempo se presentan dos soluciones numéricas, una mediante el método tradicional de diferencias finitas y la otra mediante el emergente método de autómatas celulares en retículas de Boltzmann, siendo esta última otra de las contribuciones importantes de este trabajo. Al final de este capítulo se compara la exactitud de estas dos aproximaciones numéricas frente a la solución analítica.

En el quinto capítulo se extiende el análisis de la cinética de la *Zymomonas mobilis*, para aplicarlo al diseño de fermentadores CSTR y de membrana. En el primer caso se utilizan los métodos de Euler y Runge-Kutta para sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias, mientras que para el biorreactor de membrana de células inmovilizadas se emplea el método de diferencias finitas. Cabe mencionar que en un biorreactor de membrana se llevan a cabo dos operaciones unitarias en un solo equipo, la reacción bioquímica y la separación de reactivos y productos, mediante el uso de una membrana semipermeable.

Los algoritmos que se formulan en esta tesis son aplicables a la descripción matemática de la operación de cualquier biorreactor enzimático o microbiano, pues el único cambio que se tendría que hacer es el de los modelos cinéticos de las reacciones para cada caso.

Objetivo General:

De acuerdo a los balances de materia infinitesimales, formular los modelos matemáticos que describan la operación de biorreactores enzimáticos y microbianos para posteriormente resolver las ecuaciones diferenciales resultantes, mediante análisis matemático o métodos numéricos tradicionales de Euler, Runge-Kutta y Diferencias Finitas, así como por el método moderno de autómatas celulares en Redes de Boltzmann.

Objetivos Particulares:

- Describir la operación de los biorreactores más comúnmente utilizados en la industria de los alimentos, así como las técnicas de inmovilización de enzimas y células.
- Describir la cinética enzimática de Michaelis-Menten y las diferentes modificaciones a este modelo que toman en cuenta las inhibiciones competitivas y no competitivas que se producen por la presencia de sustrato y producto, formulando algoritmos computacionales para su caracterización matemática.
- Describir los modelos matemáticos para la dinámica poblacional microbiana, tomando en cuenta las diferentes fases que se presentan durante su desarrollo, como el periodo de latencia, el crecimiento exponencial, el régimen estacionario y el periodo de muerte, formulando algoritmos propios para su simulación computacional.
- Formular un algoritmo computacional para el fenómeno de crecimiento diáuxico de una población de microorganismos en presencia de un par de sustratos, dentro de un reactor CSTR.
- Escribir un algoritmo de cómputo que permita simular las oscilaciones periódicas que se presentan dentro de un biorreactor CSTR que contenga un sustrato y dos microorganismos, donde uno de ellos se alimenta de puro sustrato y el segundo microorganismo se alimenta del primero (sistema depredador-presa).

- Describir el cálculo del tiempo de residencia de biorreactores ideales tipo CSTR y PFR, en estado estacionario, incluyendo la forma en que se puede optimizar un arreglo de biorreactores ideales.
- Formular un algoritmo de cómputo para la operación de un reactor enzimático tipo semibatch.
- Resolver analíticamente, mediante series de Fourier, la ecuación de difusión en coordenadas esféricas, para comparar la exactitud de las aproximaciones numéricas por diferencias finitas y retículas de Boltzmann.
- Formular un algoritmo basado en autómatas celulares de redes de Boltzmann para una reacción enzimática tipo Michaelis-Menten en el interior de pellets esféricos de reactores de membrana de enzima inmovilizada.
- Resolver mediante análisis matemático aplicando series de Fourier, la ecuación diferencial gobernante de un reactor de flujo en pistón con dispersión axial operando en régimen transitorio, con la finalidad de tener la solución exacta contra la cual comparar la exactitud que brindan los métodos numéricos de diferencias finitas y retículas de Boltzmann.
- Utilizar los métodos de Euler y Runge-Kutta para el diseño y optimización de un fermentador CSTR con *Zymomonas mobilis*, que conduce a un comportamiento oscilatorio de las diferentes especies químicas y biológicas.
- Aplicar el método de Diferencias Finitas para el diseño de un fermentador de membrana de células inmovilizadas, utilizando *Zymomonas mobilis* como especie biológica.

Capítulo 1

Generalidades

Resumen

En este capítulo inicial, se describen las características principales de los catalizadores enzimáticos y las dos formas en que se utilizan en aplicaciones industriales, ya sea libres (disueltas) o inmovilizadas. Luego se profundiza en los diferentes métodos de inmovilización (adsorción, enlace covalente, entrapamiento y confinamiento en membrana), información que será útil en el diseño de los equipos de proceso. Posteriormente se describe el funcionamiento de los diferentes modelos de biorreactores enzimáticos que se han diseñado desde principios del siglo XX hasta la actualidad, remarcando las ventajas y desventajas de algunos de los modelos más recientes. Además se describen también los diferentes tipos de biorreactores microbianos que se utilizan actualmente en la industria, así como las características y aplicaciones de los fermentadores recientemente desarrollados. Dejando para el capítulo 3 la descripción del uso de diferentes tipos de microorganismos, junto con el análisis matemático de la dinámica poblacional.

1.1 Enzimas

De todas las funciones de las proteínas, **la catálisis** es probablemente la más importante [1]. En la ausencia de catalizadores, la mayoría de las reacciones en los sistemas biológicos sucederían demasiado lentas como para aportar productos necesarios a un ritmo adecuado para procesos fisiológicos o aplicaciones industriales. Los catalizadores que tienen esta función se llaman enzimas. Excepto algunos ARN (ribosomas), todas las demás enzimas son proteínas globulares.

Las enzimas son los catalizadores conocidos más eficientes; pueden incrementar la rapidez de una reacción dada por un factor hasta 10^{20} sobre las reacciones no catalizadas [1]. A diferencia, los catalizadores no enzimáticos estimulan la velocidad de reacción sólo por factores entre 10^2 y 10^4 . Poseen alta especificidad, al grado de ser capaces de distinguir varios estereoisómeros de un mismo compuesto, y con base en ello incrementar la velocidad de una reacción específica. Funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. En muchos casos, las acciones de las enzimas están finamente sintonizadas por los procesos regulatorios.

Las enzimas se clasifican según la reacción catalizada [2]. Muchas se han designado añadiendo el sufijo “asa” al nombre del sustrato sobre el que actúan o alguna palabra frase que describa su actividad. Por ejemplo la ureasa cataliza la hidrólisis de urea.

Otras enzimas fueron bautizadas por sus descubridores, luego que se conociera su reacción específica, por ejemplo, la pepsina fue denominada así por el vocablo griego “*pepsis*” (digestión), ya que actúa en la digestión de los alimentos. En otros casos el nombre procede de su origen: la tripsina recibió su nombre por el vocablo griego *tryein*, “desgastar”, ya que se obtuvo frotando tejido pancreático con glicerina. Sin embargo existe una clasificación Internacional regulada por el comité de nomenclatura de la *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, que se muestra a continuación [2]:

Tabla 1.1 Clasificación internacional de enzimas		
Nº de clase	Nombre de la clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasa	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomo de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Rotura de C-C, C-O, C-N u otros enlaces por eliminación, dejando dobles enlaces o anillos o adición de grupos a dobles enlaces.
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas.
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP o un cofactor similar

Fuente: Clasificación Internacional regulada por la, Union of Biochemistry and Molecular Biology.

1.2 Enzimas libres e inmovilizadas

La mayoría de las enzimas industriales son enzimas hidrolíticas que pueden degradar moléculas poliméricas de alto peso molecular. A pesar de que las enzimas inmovilizadas son cada vez más adecuadas desde el punto de vista técnico-económico, las enzimas libres aún son utilizadas en muchos de los procesos industriales.

Se pueden utilizar enzimas libres disueltas en una gran variedad de casos; sin embargo, en muchas aplicaciones prácticas es conveniente emplear enzimas

inmovilizadas. La inmovilización enzimática consiste en fijar las moléculas de la enzima a una matriz soporte macroscópica [3].

Las enzimas inmovilizadas ofrecen varias ventajas respecto a las enzimas libres:

- Como las enzimas son caras, su reutilización es un factor crítico. Cuando se utilizan enzimas libres disueltas, normalmente retienen algo de actividad después del proceso, siendo muy difícil recuperarlas para reprocesamiento. Una de las principales ventajas de las enzimas inmovilizadas es que pueden ser reutilizadas.
- Las enzimas libres pueden contaminar el producto y su remoción puede involucrar costosos procesos de separación adicionales. El beneficio más importante que se obtiene al usar enzimas inmovilizadas es que no se requieren procesos de separación y purificación de la enzima. La pureza del producto suele ser de alta calidad y se disminuyen los problemas de manejo de efluentes, principalmente si el catalizador biológico es tóxico o antigénico.
- Las enzimas inmovilizadas pueden utilizarse en una amplia variedad de configuraciones de reactor; y debido a que generalmente se obtienen altas concentraciones del biocatalizador, la productividad se eleva tanto como es posible, lo cual conduce a bajos costos de capital. También permiten que durante la operación continua se ahorre en enzimas, labor y costos en general.
- A una enzima inmovilizada se le pueden alterar selectivamente sus propiedades físicas o químicas, permitiendo un mejor ambiente para la actividad enzimática. Por lo tanto las enzimas inmovilizadas a menudo son más estables que las enzimas libres disueltas. También es importante notar que las propiedades de los soportes utilizados para inmovilizar enzimas pueden ser explotadas para modificar la actividad enzimática.

1.3 Métodos de inmovilización

Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre la superficie o en el interior de soportes solubles en agua mediante una amplia variedad de métodos. En años recientes se han reportado cientos de métodos de inmovilización de enzimas. En seguida se describen solo unos cuantos de dichos métodos, comparando sus ventajas y desventajas [3, 4].

Existen cuatro métodos principales: adsorción, enlace covalente, entrampamiento y confinación en membranas.

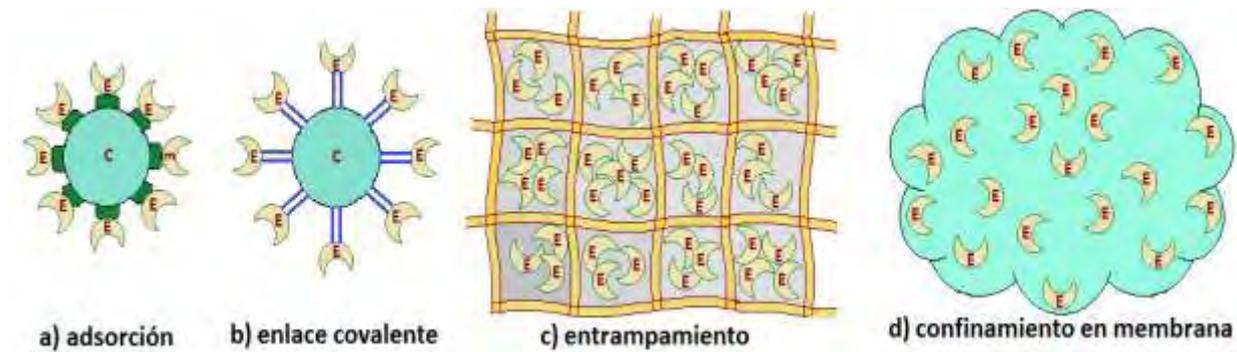


Figura 1.1. Diferentes métodos de inmovilización de enzimas

1.3.1 Adsorción

La forma más simple de inmovilizar moléculas de enzimas es adhiriéndolas a la superficie de las partículas de soporte mediante fuerzas físicas. Comúnmente la fuerza promotora de este tipo de enlace es una combinación de efectos hidrofóbicos con la formación de varios enlaces salinos por molécula de enzima. El protocolo de inmovilización consiste en exponer la enzima disuelta en solución a la superficie activa del adsorbente bajo condiciones apropiadas de pH, tensión iónica, temperatura, etc. Los adsorbentes más frecuentemente empleados pueden ser materiales inorgánicos tales como la alúmina, el carbono, el carbonato de calcio, o materiales orgánicos entre los que se puede citar a la celulosa, almidones, así como resinas de intercambio aniónico y catiónico. En años recientes se han desarrollado nanomateriales funcionalizados, mediante autoensamblaje de moléculas de enzima y del nanomaterial, muy eficientes para la inmovilización enzimática.

Las ventajas de las técnicas de adsorción para la inmovilización enzimática son las siguientes [4]:

1. La adsorción de las enzimas a las matrices es muy fácil y capaz de soportar alta carga enzimática.
2. Es posible separar y purificar las enzimas mientras están siendo inmovilizadas
3. Los sitios activos de las enzimas adsorbidas no son habitualmente afectados durante el proceso, por lo tanto las enzimas no son desactivadas por su adsorción
4. Es posible remover con facilidad las enzimas de su soporte, debido a la que la adsorción es un proceso reversible

Sin embargo los métodos de adsorción para inmovilización enzimática también exhiben algunas desventajas:

1. La desorción de las enzimas es un proceso común que limita la eficiencia de la inmovilización.

2. La dinámica de la inmovilización es muy sensible al pH, tensión iónica y temperatura de la solución
3. La cantidad de enzimas cargadas sobre las partículas de soporte es comúnmente baja debido a las débiles fuerzas de interacción.

1.3.2 Enlace covalente:

Una alternativa a la adsorción física es el enlace covalente, que consiste en la retención de la enzima sobre superficies de soporte mediante la formación de enlaces covalentes. Como las enzimas contienen típicamente una combinación de grupos funcionales que son potencialmente reactivos ante una amplia variedad de agentes químicos comunes, las moléculas de la enzima pueden ser covalentemente unidas, a matrices insolubles, vía residuos amino-ácidos no esenciales. Una variación del enlace covalente es la copolimerización de la enzima con un monómero reactivo; en este caso las moléculas de enzima se entrelazan fuertemente unas con otras, ya sea con o sin un soporte adicional, produciendo entonces una red polimérica-enzimática.

Los grupos funcionales de las enzimas que se unen al material soporte deben ser residuos de aminoácidos no esenciales, no localizados en los sitios activos. Los grupos más adecuados para el proceso de inmovilización pueden ser los aminos, carboxilos, hidroxilos y sulfhidrilos. En particular los residuos de la lisina son los grupos más útiles para el enlace covalente debido a su amplia superficie expuesta y alta reactividad, especialmente en soluciones alcalinas; además muy raramente aparecen en los sitios activos de las enzimas. Algunos soportes comunes insolubles en agua utilizados para la inmovilización de enzimas covalentes son: soportes sintéticos poliméricos con base en acrilamida, anhídrido maleico, ácido meta acrílico o estireno; también se utilizan polipéptidos, así como soportes naturales como el vidrio, la agarosa, la celulosa, la dextrana y el almidón. Los grupos funcionales sobre los materiales soporte son activados habitualmente mediante el uso de agentes químicos tales como el bromuro de cianógeno, la carbodiimida y el glutaraldehído. Las matrices más comúnmente empleadas para inmovilización enzimática covalente incluyen a la agarosa, las celulosas y las poliacrilamidas.

Las principales ventajas de los métodos de inmovilización por enlace covalente están asociadas a la intensidad de la fuerza del enlace, que permite eliminar pérdidas de catalizador biológico. Sin embargo, este método de inmovilización presenta las siguientes desventajas [3, 4]:

- No es posible la regeneración del biocatalizador
- El enlace covalente a sitios múltiples en las moléculas de enzima puede conducir a pérdida de la actividad enzimática ya sea por cambios significativos en los sitios activos de la enzima o por la inmovilización de la enzima con una orientación particular no adecuada, en la cual se distorsiona la geometría del sitio activo y los hace indisponibles.

- Los reactivos involucrados en el enlace covalente encarecen el procedimiento de inmovilización
- La carga enzimática es comúnmente baja (alrededor de .02 g/g de matriz).

1.3.3 Entrampamiento

El entrampe es un procedimiento físico en el que se confinan las enzimas en un pequeño espacio. Las enzimas pueden ser entrampadas en el interior de cadenas poliméricas entrecruzadas mediante la formación de una malla polimérica alrededor de las moléculas de enzima, produciéndose geles, fibras o cápsulas. No hay enlace químico entre las moléculas de enzima y la matriz polimérica, por lo tanto no hay modificación química de la actividad enzimática. Sin embargo este método de inmovilización exhibe las siguientes desventajas [3, 4]:

- La difusión del sustrato hacia la enzima y de los productos hacia el exterior de la malla polimérica puede presentar dificultades. Sin embargo los problemas de difusión pueden ser eliminados reduciendo el tamaño de las partículas de las matrices o cápsulas.
- Las enzimas puede ser desactivadas durante la formación de geles.
- La fuga de las enzimas también es un serio problema; por ejemplo, puede suceder una fuga al interior de la solución debido a la ruptura de los geles o cápsulas. Sin embargo este problema puede ser resuelto reduciendo el peso molecular de las membranas o el tamaño de poro de las matrices sólidas.
- Carencia de control de las condiciones microambientales en el interior de las matrices sólidas, lo cual cuando se presenta, reduce drásticamente la actividad y estabilidad enzimática. Sin embargo, se pueden obtener mejores condiciones microambientales utilizando diferentes matrices e ingredientes químicos, o cambiando las condiciones de procesamiento, o reduciendo el tamaño de las partículas y cápsulas.
- Las moléculas grandes de sustrato enfrentan grandes dificultades para aproximarse a los sitios catalíticos de las enzimas entrampadas, lo cual impide el uso de este método para sustratos de alto peso molecular.

Las matrices que se utilizan para inmovilización son comúnmente materiales poliméricos como el alginato de calcio, la poliacrilamida y el colágeno. Sin embargo, también se utilizan algunas matrices sólidas como el carbón activado, cerámica porosa y tierras de diatomeas. La matriz puede estar conformada por partículas, membranas o fibras. El polímero de cadena cruzada más ampliamente utilizado es el gel de poliacrilamida. Cuando la inmovilización se lleva a cabo con una matriz polimérica, la solución enzimática se mezcla con la solución monomérica antes de la polimerización; luego el material se extruye para darle forma a las partículas. [5]

El entrampe y la adsorción superficial pueden ser utilizados en combinación en algunos casos. El entrampamiento en membrana es un ejemplo. Se han utilizado

fibras huecas para entrapar soluciones enzimáticas entre membranas delgadas semipermeables hechas de nylon, celulosa polisulfona o poliacrilato. Para retener enzimas, que son compuestos de alto peso molecular, se utilizan membranas semipermeables, que además permiten el paso de compuestos de bajo peso molecular como las moléculas de sustrato y producto. Los métodos de entrapamiento suelen utilizar membranas con poros suficientemente pequeños para impedir la liberación de las enzimas pero permitir el paso de sustratos y productos a través de ella. Dentro del entrapamiento, la enzima permanece en solución, y cualquier efecto potencial adverso resultante de la adsorción o enlace covalente puede ser evitado mediante este método.

1.3.4 Confinamiento en membrana

Esta es una forma especial del entrapamiento en membrana, en la que moléculas de enzima en solución acuosa pueden ser confinadas en el interior de una membrana semipermeable. Con este método se forman esferas microscópicas huecas que contienen en su interior la solución enzimática, las cuales a su vez se encuentran endosadas dentro de una membrana porosa. La membrana puede ser polimérica o una frontera interfacial formada alrededor de una gota.

Las técnicas de confinamiento en membrana dependen de su naturaleza semipermeable. El método más simple consiste en dividir el reactor en dos compartimientos mediante una membrana semipermeable; una de los compartimientos contiene la enzima, mientras que el otro contiene a las corrientes de reactivo y producto. Comercialmente se dispone de membranas fibrilares huecas, que poseen una gran área superficial en proporción a su volumen, y que son permeables a sustratos de peso molecular considerablemente menor al de las moléculas de enzima.

La inmovilización mediante esta técnica requiere de un alto costo de inversión, pero frecuentemente el beneficio económico es mayor, al utilizarse enzimas inmovilizadas. En general, el método de inmovilización para una enzima y aplicación particular depende de varios factores [3, 4]:

- El costo tanto de la enzima como del soporte
- El tiempo de vida útil de la enzima inmovilizada. Es preferible si el transportador puede ser regenerado después del tiempo de vida útil de la enzima inmovilizada.
- La capacidad de enlace del material soporte
- La estabilidad y la retención de la actividad enzimática, la cual depende de los grupos funcionales presentes en el material soporte y las condiciones ambientales.
- La naturaleza del soporte, ya que afecta la actividad enzimática y su cinética aparente.

- La forma, densidad, porosidad, distribución, estabilidad operacional y tamaño de partícula de la matriz soporte tiene influencia en el tipo de reactor donde se llevará a cabo el proceso de biocatálisis.

1.4 Tipos de reactores enzimáticos

El corazón de los bioprocesos típicos es el reactor o fermentador, flanqueado por operaciones unitarias donde se realizan cambios físicos para la preparación del medio o recuperación de los productos. El reactor es donde ocurren las principales transformaciones bioquímicas. Existen modelos clásicos [4, 5] y novedosos [6, 7].

1.4.1 Reactor batch de tanque agitado (STR)

Aún es el tipo más ampliamente usado; su principio de operación es relativamente sencillo. El sustrato y la enzima se introducen dentro de un tanque, el cual normalmente está equipado con mamparas que mejoran la eficiencia de la agitación y consecuentemente la transferencia de masa. En todo tipo de reactor es necesario controlar la temperatura y el pH para asegurar las condiciones óptimas de operación, pero en el STR el control es simple; por lo cual este tipo de reactor es adecuado para una gran variedad de operaciones industriales, esencialmente para sustratos de alta viscosidad y baja solubilidad; además es adecuado cuando se dispone de bajo capital para inversión y operación. Sin embargo, los STR exhiben varias desventajas tales como baja eficiencia de reacción, altos insumos energéticos necesarios para la agitación y la necesidad de remover las enzimas de los productos una vez que se ha completado el proceso.

Dentro de los reactores de tanque agitado, el reactor batch (BSTR) es el más sencillo. El contenido del reactor debe ser intensamente agitado para asegurar homogeneidad de la mezcla reaccionante durante todo el proceso. El contenido del reactor se remueve periódicamente para alimentar la siguiente carga. Se puede operar con enzimas libres o inmovilizadas. El BSTR es útil para soluciones de sustrato de alta viscosidad y para enzimas inmovilizadas con relativamente baja actividad. Si embargo, un problema grave que ocurre frecuentemente es que la enzima inmovilizada tiende a descomponerse debido a los esfuerzos mecánicos a los que se ve sometida por la intensa agitación. El sistema batch es generalmente adecuado para la producción a pequeña escala [4].

El segundo tipo de reactor STR es el de flujo continuo (CSTR) con alimentación constante de reactivos, basándose también en la consideración de que el contenido será perfectamente agitado para asegurar homogeneidad dentro del reactor. La corriente de sustrato se bombea de manera continua al interior del reactor, al mismo tiempo que se remueve el producto, de forma tal que el volumen del reactor permanece invariable. Se asume que la concentración dentro del reactor es igual a la

concentración de la corriente de salida. El CSTR es fácil de construir, versátil y barato; además la carga y reemplazo del biocatalizador es simple. Comparado al BSTR, el CSTR es más eficiente y permite mayor productividad, aunque es un poco más difícil de controlar.

Sin embargo, el alto costo de las enzimas impide su adición continua a un CSTR; por lo tanto es conveniente que la enzima sea retenida dentro del reactor; para ello, la técnica más común es utilizar un reactor CSTR/UF combinado, el cual es una combinación de un CSTR con una unidad de ultrafiltración. Una membrana de ultrafiltración continua es un dispositivo que se añade a la salida del CSTR, de manera que la enzima aún útil es removida de la corriente de producto y recirculada al interior del biorreactor. También puede utilizarse una malla de fibra hueca. Esta combinación CSTR/UF es adecuada para sustratos de alto peso molecular y para productos de bajo peso molecular [5]. La inmovilización de las enzimas dentro de pellets inmovilizados dentro del biorreactor, es otra alternativa. Algunas partículas magnéticas son útiles para atraer las enzimas, lo cual facilita la separación de las enzimas a la salida del reactor mediante un campo magnético.

1.4.2 Reactor de lecho empacado, PBR

El PBR es un reactor con enzima inmovilizada, en el cual el sustrato entra en un extremo de un tubo cilíndrico y el producto sale por el extremo opuesto. La característica más importante del PBR es que la mezcla reaccionante fluye a través del reactor como un flujo en pistón, por lo que también se les denomina PFR. La longitud del tubo y la ausencia de agitación impiden completo mezclado dentro del reactor. Las propiedades de la corriente reaccionante varían tanto en dirección radial como axial, pero la variación radial frecuentemente es mucho menor que a lo largo del eje del tubo. Idealmente, toda la corriente de sustrato tiene la misma velocidad, paralela al eje del reactor, sin retromezclado; aunque en la realidad puede haber difusión en sentido contrario al flujo. Con la finalidad de lograr el flujo pistón ideal, se prefiere flujo turbulento, mejorándose el mezclado y la transferencia de calor radial, reduciendo además el retromezclado axial. Debido al tipo de flujo en el interior de reactor, también se le denomina reactor tubular enzimático. Generalmente se utilizan enzimas inmovilizadas. Algunas de las ventajas de este tipo de reactor son su sencillez de operación y de implementación de control automático, bajos costos de operación, estabilidad de las condiciones de operación y facilidad en el control de la calidad de los productos. Quizá la ventaja más significativa es que se pueden utilizar altas concentraciones de enzimas inmovilizadas. Con la enzima inmovilizada en el interior del reactor, la corriente de sustrato fluye a través del canal cilíndrico transformándose en producto, el cual es colectado como efluente del biorreactor. Este sistema heterogéneo facilita la separación del producto. Respecto a la conversión, se puede obtener cualquier grado de avance de reacción con la adecuada longitud del PBR. En comparación con los CSTR, los PBR son preferidos para procesos en los

que existe inhibición del producto, activación del sustrato y reacción reversible. Figura 2.

Las desventajas del PBR son las siguientes [4]:

- La configuración de los PBR no permite el control de pH por adición de ácidos o bases, ni fácil control de temperatura en operaciones donde se requiera una excesiva liberación de calor, un problema que es más notable en reactores de gran escala.
- La concentración de sustrato y producto cambian a lo largo de la longitud del biorreactor.
- Las enzimas inmovilizadas son fácilmente deterioradas por la formación de coloides o precipitados, por lo que se requiere de limpieza o cambio de las enzimas inmovilizadas.
- Después de algún tiempo pueden presentarse algún círculo vicioso con problemas de retropresión, deformación de las partículas y obstaculización de flujo, que eventualmente puede bloquear el flujo a través del reactor [4].
- Se pueden formar canales en el interior del reactor debido a la caída de presión excesiva, empaque irregular, o carga irregular de las corrientes de sustrato, provocando diferencias de flujo volumétrico a lo largo del reactor [4].

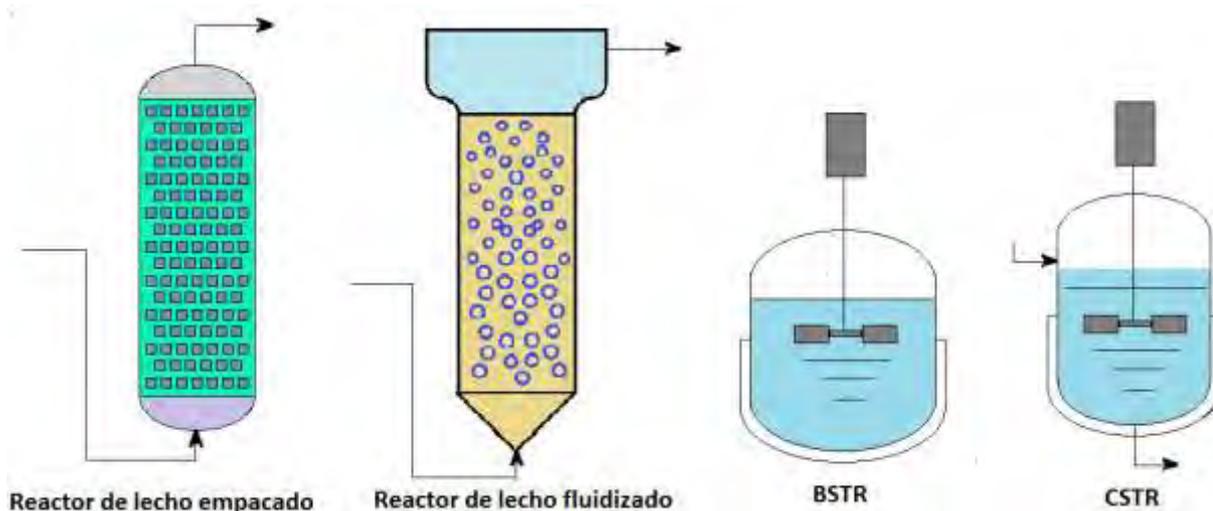


Figura 1.2. Diferentes tipos de biorreactores enzimáticos.

1.4.3 Reactor de lecho fluidizado, FBR

Consiste en un lecho fluidizado de enzima inmovilizada, que se pone en movimiento vertical hacia arriba mediante una corriente de sustrato puro [8]. El sustrato se hace fluir verticalmente a través del lecho de enzima inmovilizada a una velocidad suficientemente alta para que floten las partículas que contienen en su interior la enzima. Hay un mínimo de velocidad necesario para alcanzar la fluidización del lecho,

que depende del tamaño, forma, densidad y porosidad de las partículas, así como de la densidad y viscosidad de la solución [8].

El FBR (Fluidized Bed Reactor) es una combinación de un CSTR y un PBR, que se comporta dinámicamente de una forma intermedia entre esos dos tipos de reactores. Las condiciones de operación del FBR definen si se comporta de manera más cercana a un CSTR o un PBR, lo cual le da flexibilidad. Por ejemplo, se puede lograr que se comporte como un CSTR si se le colocan mamparas, de manera tal que se evite el retromezclado. Comúnmente se elige un FBR cuando se requiere flexibilidad entre los dos comportamientos, por ejemplo cuando se requiere alta conversión pero la corriente de sustrato es coloidal o la reacción produce un cambio sustancial de pH o gran liberación de calor [4, 8]

Normalmente se utilizan pequeñas partículas de enzima inmovilizada en los reactores FBR, con la finalidad de alcanzar altas áreas de superficie biocatalítica. Dichas partículas deben ser suficientemente densas en relación a la corriente de sustrato, de manera que no sean expulsadas fuera del reactor. Para una eficiente operación, el tamaño de las partículas debe ser lo más homogéneo posible; si no es así, se formarán gradientes de concentración biocatalítica no uniformes dentro del reactor. Comúnmente se diseñan para un amplio intervalo de flujos volumétricos. Las ventajas que presenta el uso de reactores FBR (Figura 1.2) son las siguientes:

- Fácil control de pH, temperatura y suministro de gas
- Alta eficiencia en la transferencia de calor y masa, lo cual hace que este modelo sea adecuado para reacciones exotérmicas
- Especialmente adecuado cuando se utilizan sustratos altamente viscosos o en forma de polvo
- Caída de presión relativamente baja aún cuando se utilizan partículas de enzima muy pequeñas

Sin embargo los FBR tienen algunas desventajas [4,8]:

- Se requiere alta energía para la fluidización del lecho
- Dificultad en el escalamiento
- Canalización y pérdida de biocatalizador cuando se utilizan muy altos flujos volumétricos
- Posibilidad de destrucción y descomposición de las enzimas inmovilizadas debido a los esfuerzos mecánicos asociados a la fluidización y las colisiones
- Solamente es adecuado para concentraciones relativamente bajas de enzimas inmovilizadas.
- Se pueden provocar grandes cambios en los patrones de flujo al modificar el flujo volumétrico de la corriente de sustrato, lo cual puede tener consecuentemente efectos inesperados sobre la rapidez de conversión

1.4.4 Reactor de membrana, MR

Esta es una combinación funcional de los procesos de catálisis enzimática y separación con membrana. El principal requerimiento es una membrana semipermeable que permita el libre paso de las moléculas producto pero restrinja el de las moléculas de enzima. Los MR pueden ser utilizados ya sea en condiciones batch o de flujo continuo, y facilita la separación de la enzima y el producto. Si un sustrato es capaz de difundirse a través de la membrana, puede ser introducido en el mismo lado o del otro lado donde se encuentre la enzima. La dinámica del MR es similar a la del BSTR en operación batch o a la del CSTR cuando opera continuamente, figura 1.2.

El caso más simple de un reactor de membrana es para el procesamiento de enzimas libres. Configuraciones más complejas ocurren cuando la corriente de sustrato fluye en el lado opuesto de la membrana con respecto a la ubicación de la enzima; en este caso la rapidez de reacción puede ser severamente limitada por los procesos de difusión del sustrato a través de la membrana y la contradifusión del producto. Bajo estas circunstancias la reacción puede ser aún más severamente limitada por procesos de inhibición o por reversibilidad de las reacciones. El diseño más práctico es un reactor MR de fibras huecas que consiste de un módulo preformado que contiene cientos de delgadas fibras tubulares, cada una con un diámetro interior de 200 a 300 micrómetros y un diámetro exterior entre 300 y 900 μm . La difusión del sustrato a través de las paredes tubulares le permite tener contacto con enzima gelizada para convertirse en producto. La subsecuente contradifusión del producto facilita su recuperación. Bajo la influencia de gradientes de presión a lo largo de la pared tubular, el producto fluye al interior de los tubos para ser colectado en un cabezal múltiple [4].

Las ventajas del MR son las siguientes:

- Debido a la facilidad con la que se puede implementar un reactor de membrana, a menudo se utilizan para producción a pequeña escala (gramos o kg), especialmente con sistemas multienzimáticos o cuando se requiere regeneración coenzimática.
- Facilita el reemplazo de las enzimas en procesos que involucran enzimas particularmente lábiles
- Pueden ser utilizados para reacciones bifásicas

Las principales desventajas de los MR son el costo de las membranas, el deterioro de la membrana por erosión y la necesidad de cambiarla periódicamente.

1.5 Diseño de reactores enzimáticos

El diseño de los biorreactores enzimáticos es una tarea desafiante. El objetivo es describir con precisión el comportamiento dinámico del reactor para controlar y optimizar la selectividad, el rendimiento, la productividad y los beneficios económicos. Bajo condiciones adecuadas, las enzimas son capaces de realizar sus funciones con un 100 % de eficiencia. Para conseguir esto, se deben especificar adecuadamente las variables de diseño, tales como concentraciones de sustrato y enzima, flujos volumétricos, temperatura y pH de operación, volumen y tipo del reactor, velocidad de agitación, número y espaciado de mamparas. Es necesario tener conocimientos de termohidrodinámica, procesos de transferencia de calor y masa, cinética química, fenómenos de superficie y métodos numéricos.

Los objetivos del diseño son aprovechar las ventajas del modelo seleccionado y disminuir o evitar sus desventajas, tratando de lograr la máxima calidad del producto y minimizar costos. Las directrices básicas para el diseño de biorreactores enzimáticos son las siguientes [4, 5]:

- Seleccionar el tipo de biorreactor más adecuado
- Tomar en cuenta las propiedades químicas y físicas de los fluidos dentro del reactor
- Optimizar las condiciones de operación para alcanzar la más alta concentración de producto al más bajo costo

1.6 Selección de reactores enzimáticos:

Existen varios factores que gobiernan sobre la selección de un tipo de reactor para un proceso particular [4, 5]:

- La forma de la enzima: Puede ser libre o inmovilizada. Cuando se utilizan enzimas libres es difícil separar la enzima de reactivos y productos, por lo que únicamente es adecuado el BSTR. Cuando se utiliza un CSTR es necesario añadir una unidad de ultrafiltración para impedir la pérdida de enzima libre. Sin embargo las ventajas de las enzimas inmovilizadas como biocatalizadores de proceso, son mejor apreciadas en equipos de flujo continuo. En estos reactores el tiempo de residencia promedio de las moléculas de sustrato es mucho más corto que los de la enzima inmovilizada. Otros factores que deben ser tomados en cuenta son la cinética de la reacción enzimática, así como las propiedades físicas y químicas del soporte inmovilizante, ya sea que se trate de una partícula, una membrana o una malla fibrosa, junto con la densidad, compresibilidad, robustez, tamaño de partícula y regenerabilidad de la enzima. por ejemplo cuando se trata de enzimas inmovilizadas en forma de partícula, conviene utilizar CSTR o PBR; Si se dispone de enzimas membranosas o

fibrosas, conviene un PBR; mientras que para enzimas de pequeño tamaño un FBR es la mejor opción.

- Las propiedades físicas de los sustratos: En principio, si el sustrato es insoluble, se puede utilizar cualquier tipo de reactor. Sin embargo, si el sustrato es de baja solubilidad, es preferible utilizar operaciones batch para operaciones de grandes volúmenes de reacción que contengan bajas concentraciones de sustrato.
- Los requerimientos de la reacción. Debe considerarse la escala del proceso, la necesidad de controlar el pH y la temperatura, el suministro y remoción de gases, así como la estabilidad de enzimas, sustratos y productos. Por ejemplo, cuando se requiere ajustar frecuentemente el pH en una reacción enzimática, es preferible utilizar un STR, mientras que si necesita suministrar oxígeno u otro gas, el FBR es la mejor opción.
- Estabilidad de las enzimas: Siempre es deseable la más alta actividad específica de la enzima. Las causas más probables de pérdida de actividad enzimática son la desnaturalización y la desconexión de la enzima del soporte. De todos los reactores mencionados en este texto, el CSTR es el que podría provocar peores problemas de este tipo de inactivación.
- Factores económicos: En general, la elección del tipo de reactor depende del costo de productividad dentro de las especificaciones de calidad del producto, que debe incluir el costo asociado con el precio del sustrato, la instrumentación, el procesamiento corriente abajo, costos de operación, depreciación, etc.

No hay una única regla estándar para la elección del tipo de reactor enzimático; se deben balancear todos los factores que tienen que ver con la operación del reactor y con el proceso completo para tomar una decisión.

1.7 Reactores enzimáticos novedosos

Los biorreactores novedosos son dispositivos no estándar con los cuales se intenta obtener un mejor funcionamiento, maximizar rendimiento, introducir nuevos métodos de producción o intensificar el proceso (llevar a cabo dos o más operaciones unitarias en un solo equipo).

Algunos de estos reactores novedosos que han aparecido recientemente en la literatura científica son: Los biorreactores de membrana en los que se lleva a cabo la reacción enzimática y simultáneamente se separan los productos (figura 1.3); los biorreactores de cilindro rotatorio que permiten intensificar los procesos de difusión de las especies químicas [6]; los reactores de burbujeo; los microbiorreactores [7] que comúnmente se utilizan en proyectos de investigación y permiten realizar estudios de cinética enzimática así como de difusión de las diferentes especies participantes en una reacción a escala microscópica (figura 1.4).

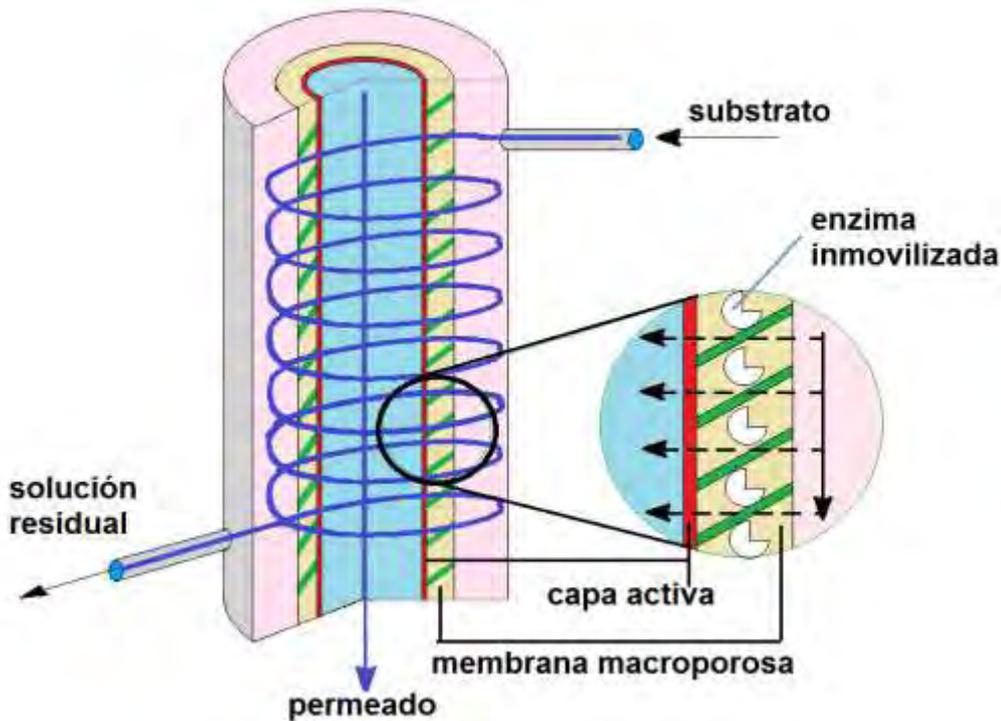


Figura 1.3 Biorreactor de membrana de enzima inmovilizada

En el capítulo 4 de este trabajo de tesis se describe matemáticamente el funcionamiento del reactor de membrana de enzima inmovilizada, pero es el único reactor novedoso que se analiza. Frecuentemente están apareciendo nuevos modelos en la literatura científica por lo que siempre es recomendable revisar periódicamente las publicaciones de revistas de Ingeniería y Tecnología.



Figura 1.4 Diferentes tipos de microbiorreactores (Hickey, Enes; Heindel, Theodore. (2014). An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer, New Jersey, Wiley

1.8 Tipos de biorreactores microbianos

Además de los modelos clásicos de reactor batch, CSTR, flujo en pistón, reactores tubulares con dispersión axial, biorreactores de membrana de células inmovilizadas y lecho empacado, así como los fermentadores de lecho fluidizado, frecuentemente se proponen nuevos modelos. Con los fermentadores, además de intentar maximizar la producción del producto deseado, manipulando rendimiento y selectividad, también debe tenerse especial atención a factores ambientales como la temperatura y pH. Otro factor importante en el diseño de un biorreactor microbiano es no provocar grandes esfuerzos mecánicos que puedan poner en peligro a la población bacteriana.

Es por ello que han aparecido recientemente algunos equipos como el biorreactor de cilindros concéntricos rotatorios, donde los rollos convectivos que se generan alrededor del cilindro interior, promueven el transporte convectivo de los nutrientes hacia las células, sin dañar mecánicamente a los microorganismos.

En la siguiente figura se presentan algunos tipos de fermentador más comúnmente empleados en la industria alimentaria:

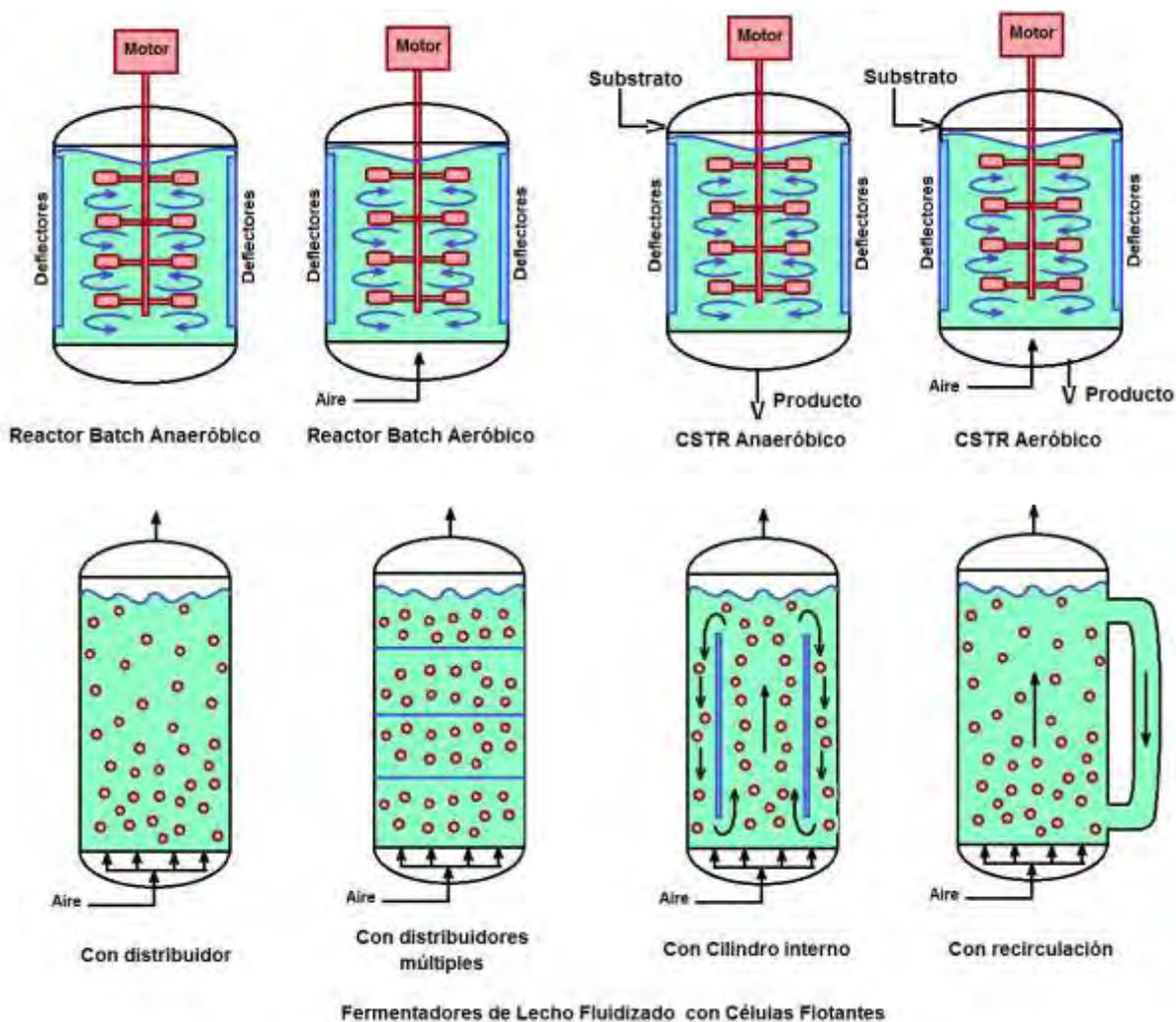


Figura 1.5 Fermentadores de Lecho Fluidizado.

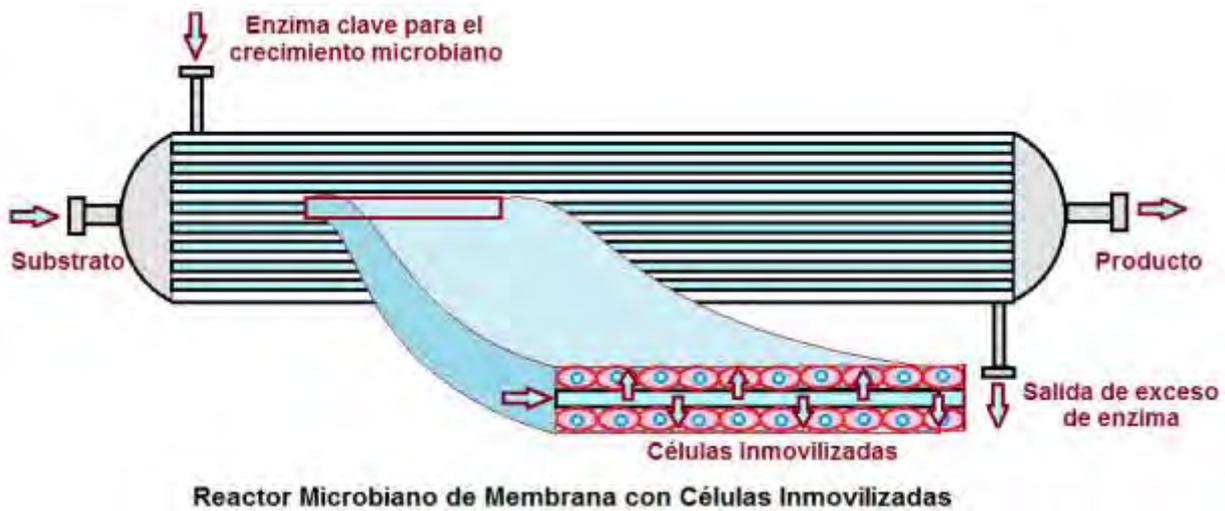


Figura 1.6 Diferentes tipos de fermentadores estándar

Conclusiones del capítulo

Es importante conocer la actualidad de los avances biotecnológicos en el diseño de reactores enzimáticos y microbianos cuando se desea hacer un trabajo que aporte algo a esta área del conocimiento. Algunos de los conceptos vertidos en este capítulo son de utilidad en los siguientes.

En el resto de la tesis, principalmente se simulará el funcionamiento de reactores batch y CSTR, pero también por ejemplo se formularán modelos matemáticos para el funcionamiento de biorreactores microbianos de células inmovilizadas en pellets esféricos, así como el de un biorreactor de membrana de células inmovilizadas.

Bibliografía

- [1] Nelson, David L, Cox, Michael M. (2015). Lehninger, Principios de Bioquímica. Madrid, Edit. Omega.
- [2] Aehle, Wolfgang. (2004). Enzymes in Industry, Production and Applications. 2nd edition. Wiley VCH
- [3] Guisan, José M., (2006). Immobilization of enzymes and cells, 2nd edition. Humana Press.
- [4] Zhang, C; Xing, X. H. (2011). Comprehensive Biotechnology Enzyme Bioreactors. Elsevier.
- [5] Williams, J. A. (2002). Keys to bioreactor selections. Chemical Engineering Progress 98: 34-41.
- [6] Kadic, Enes; Heindel, Theodore. (2014). An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer. New Jersey. Wiley.
- [7] Hickey, A.M. et al (2007). Immobilization of thermophilic enzymes in miniaturized flow reactors.
- [8] Bódalo, A, et al. (1995). Fluidized bed reactors operating with immobilized enzyme systems. Enzyme and Microbial Technology. 17: 915-922.
- [9] Straathof, Adrie J.J.; Adlercreutz, Patrick (2005). Applied Biocatalysis 2nd edition. Harwood Academic Publishers.

Capítulo 2

Cinética Enzimática y Biorreactores Batch

Resumen

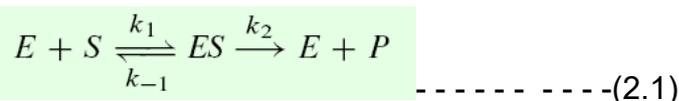
Este capítulo se dedica a la formulación matemática de los modelos para cinética enzimática. El modelo clásico es el de Michaelis-Menten, que describe con alta precisión el mecanismo de la acción enzimática elemental. Modelos más avanzados, pero basados en el de Michaelis-Menten, incluyen inhibición por parte del sustrato y producto. Para cada uno de dichos modelos se escriben los algoritmos de cómputo correspondientes, aplicados a procesos en reactores batch.

2.1 Cinética de Michaelis-Menten

Los catalizadores más importantes en sistemas biológicos son las enzimas. Las enzimas son moléculas de proteínas que se desdoblán en una estructura tridimensional para permitir la interacción con uno o varios sustratos en ubicaciones específicas denominadas sitios activos, que es donde se encuentran ubicados los grupos funcionales reaccionantes dentro de la larga cadena molecular. Estos biocatalizadores tienden a ser muy selectivos, pues una enzima particular acelera solamente una reacción específica [1, 2, 3].

Comúnmente la actividad enzimática es un proceso fisicoquímico complejo que involucra varios factores como la concentración de enzima, sustrato productos, activadores e inhibidores, el pH, la tensión iónica y la temperatura. Si se analiza con precisión la influencia de todos estos factores, se puede llegar a elucidar el mecanismo de la reacción enzimática, es decir, el orden en el cual los sustratos y productos se enlazan a la enzima y los fenómenos mediante los cuales los activadores e inhibidores alteran la rapidez de reacción.

El mecanismo que mejor se adapta a la descripción de la actividad enzimática es el propuesto por Michaelis y Menten en 1913, el cual describe la forma en que una enzima libre (E) se enlaza a una molécula de sustrato (S) para formar un complejo enzima-sustrato (ES), liberándose el producto (P), luego de la transformación química, y dejando a la enzima disponible para una nueva transformación:



Aplicando la ley de acción de masas a este esquema de reacción, se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas, para la evolución de cada una de las especies:

$$\frac{dS}{dt} = -k_{-1}ES \text{ ----- (2.2)}$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2ES^* \text{ ----- (2.3)}$$

$$\frac{dE}{dt} = -k_{-1}ES + k_2ES^* \text{ ---- (2.4)}$$

$$\frac{dES^*}{dt} = k_1ES - k_2ES^* \text{ ----- (2.5)}$$

2.2 Biorreactores batch

Como se mencionó en el capítulo 1, este tipo de reactores consiste en un recipiente en el cual se introducen los sustratos y las enzimas o microorganismos, esperando un tiempo adecuado para que se lleve a cabo la conversión deseada, separando los productos al final de la operación [2, 3].

Como operan en régimen transitorio, el modelo matemático que describe la dinámica de estos reactores son ecuaciones diferenciales; ordinarias si se implementa un buen mezclado o parciales si el sistema es no homogéneo. Para asegurar el rendimiento y calidad del producto, la operación comúnmente se lleva a cabo bajo ambientes controlados, es decir imponiendo valores adecuados de concentración, temperatura, pH, cantidad de oxígeno, agitación, etc.

La dinámica de un biorreactor batch perfectamente agitado es dominada por la cinética enzimática o microbiana, pues no existen barreras difusivas. En los temas que siguen se describe matemáticamente el funcionamiento de este tipo de biorreactores.

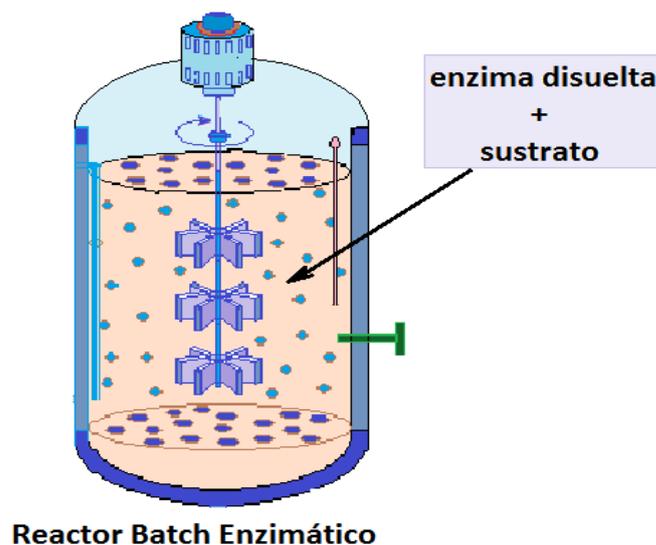


Figura 2.1 Representación esquemática de un biorreactor batch con reacción en fase homogénea

2.2.1 Algoritmo de cómputo para la cinética de Michaelis-Menten en un biorreactor batch.

Aplicando el método de Runge-Kutta, considerando valores de los coeficientes cinéticos $k_1 = 2$, $k_{-1} = 1$ y $k_2 = 1$, se obtiene el algoritmo de cómputo que se presenta a continuación:

```
function bioreactorbatch
% bioreactor cstr balances hechos con base en horas
clear all; close all; clc;
kmas=4;kmenos=1;%parámetros cinéticos para reacción reversible
k2=.5;%parámetros cinéticos para reacción irreversible
S0=5;E0=2;%concentración inicial de sustrato y enzima
ES=0;P=0;S=S0;E=E0;%condiciones iniciales
deltat=.0001;nit=50000;%parámetros de la simulación
%condiciones iniciales
for i=1:nit
    t = (i-1)*deltat; %especificación del tiempo correspondiente a cada iteración
    % método de Runge-Kutta
    rs1=-kmas*E*S; % rapidez de reacción de sustrato
    re1=-kmas*E*S+k2*ES;% rapidez de reacción de enzima
    res1=kmas*E*S-kmenos*ES-k2*ES; % rapidez de formación de complejo ES
    rp1=k2*ES; % rapidez de formación de producto
    cs1=rs1/2*deltat+S;%concentración de sustrato primer paso de Runge-Kutta
    ce1=re1/2*deltat+E; %concentración de enzima primer paso de Runge-Kutta
    ces1=res1/2*deltat+ES; %concentración complejo ES primer paso de Runge-Kutta
    cp1=rp1/2*deltat+P; %concentración de producto primer paso de Runge-Kutta
    rs2=-kmas*ce1*cs1; %rapidez reacción sustrato 2o paso de Runge-Kutta
    re2=-kmas*ce1*cs1+k2*ces1; %rapidez reacción enzima 2o paso de R-K
    res2=kmas*ce1*cs1-kmenos*ces1-k2*ces1; %rapidez reacción ES 2o paso de R-K
    rp2=k2*ces1; %rapidez producción producto 2o paso de R-K
    cs2=rs2/2*deltat+cs1; %concentración sustrato 2o paso de Runge-Kutta
    ce2=re2/2*deltat+ce1; %concentración enzima 2o paso de Runge-Kutta
    ces2=res2/2*deltat+ces1;%concentración complejo 2o paso de Runge-Kutta
    cp2=rp2/2*deltat+cp1; %concentración producto 2o paso de Runge-Kutta
    rs3=-kmas*ce2*cs2; %rapidez reacción sustrato 3er paso de Runge-Kutta
    re3=-kmas*ce2*cs2+k2*ces2; %rapidez reacción enzima 3er paso de Runge-Kutta
    res3=kmas*ce2*cs2-kmenos*ces2-k2*ces2; %rapidez reacción ES 3er paso de R-K
    rp3=k2*ces2; %rapidez producción producto 3er paso de Runge-Kutta
    cs3=rs3/2*deltat+cs2; %concentración sustrato 3er paso de Runge-Kutta
    ce3=re3/2*deltat+ce2; %concentración enzima 3er paso de Runge-Kutta
    ces3=res3/2*deltat+ces2; %concentración complejo 3er paso de Runge-Kutta
    cp3=rp3/2*deltat+cp2; %concentración producto 3er paso de Runge-Kutta
    rs4=-kmas*ce3*cs3; %rapidez reacción sustrato 4o paso de Runge-Kutta
    re4=-kmas*ce3*cs3+k2*ces3; %rapidez reacción enzima 4o paso de Runge-Kutta
    res4=kmas*ce3*cs3-kmenos*ces3-k2*ces3; %rapidez reacción ES 4o paso de R-K
    rp4=k2*ces3; %rapidez producción producto 4o paso de R-K
    S=S+1/6*(rs1+2*rs2+2*rs3+rs4)*deltat; %concentración del sustrato en el tiempo t
    E=E+1/6*(re1+2*re2+2*re3+re4)*deltat; %concentración de enzima en el tiempo t
    ES=ES+1/6*(res1+2*res2+2*res3+res4)*deltat; %concentración complejo ES en el tiempo t
    P=P+1/6*(rp1+2*rp2+2*rp3+rp4)*deltat; %concentración del producto en el tiempo t
    S=S/(S+P+ES)*S0;P=P/(S+P+ES)*S0;%normalización sustrato y producto
    E=E/(E+ES)*E0;ES=ES/(ES+E)*E0;%normalización enzima y complejo ES
    contar = i/500;
```

```

if ((contar-ceil(contar))==0)
  figure (1)
  plot (t,S,'.'); hold on;grid on;
  plot (t,E,'.r');hold on;grid on;
  plot (t,ES,'.g');hold on;grid on;
  plot (t,P,'.m');hold on;grid on;
else
  end
end
end

```

2.2.2 Resultados gráficos de la cinética de Michaelis-Menten en un biorreactor batch

Para concentraciones iniciales de sustrato, $S_0 = 5$ y enzima $E_0 = 2$, en ausencia de producto y complejo enzima-sustrato al inicio de la reacción, se obtiene la evolución de las concentraciones de cada una de las especies que se muestra en la siguiente figura:

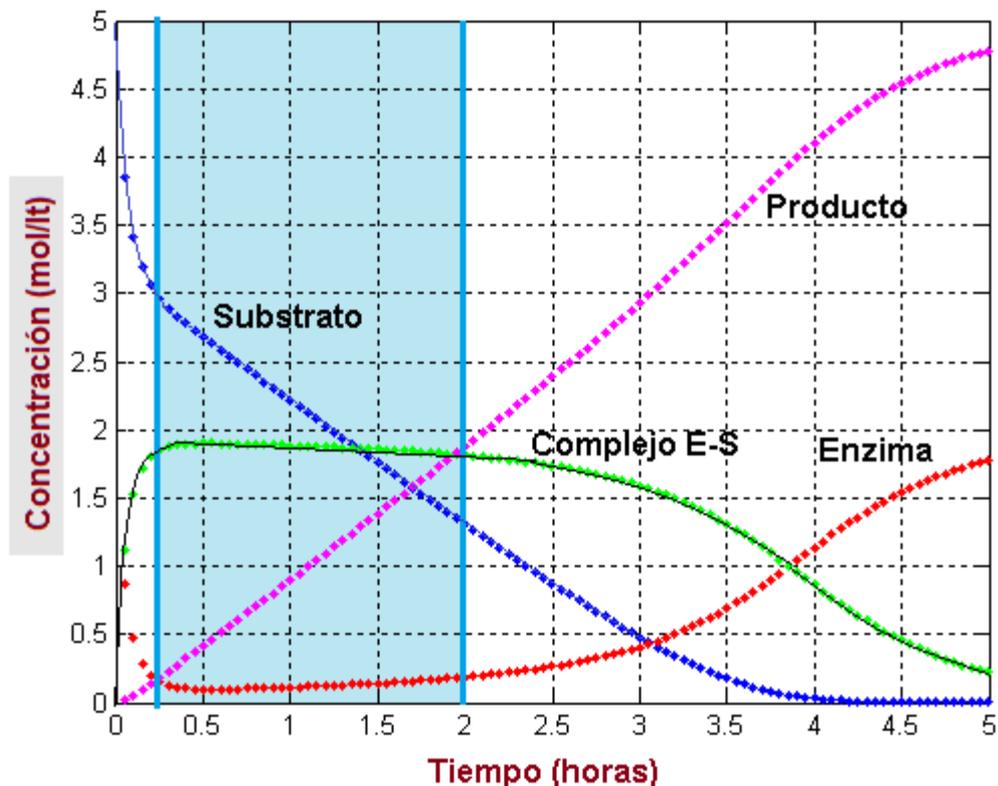


Figura 2.2. Evolución de la concentración de las diferentes especies dentro de un reactor batch perfectamente agitado para cinética de Michaelis-Menten

Puede observarse que: La concentración inicial de la enzima se recupera al final de la reacción, tal como corresponde a un biocatalizador; existe un intervalo de tiempo, entre 0.25 y 2 horas, durante el cual la concentración de la enzima permanece casi constante y consecuentemente la rapidez de formación de producto también, dando

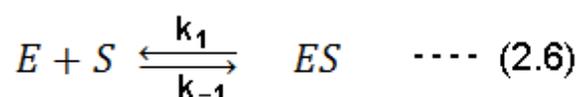
lugar a líneas rectas en las gráficas de la evolución de concentraciones de reactivo y producto.

2.3 Simplificaciones del modelo cinético de Michaelis-Menten

Se pueden hacer diferentes consideraciones para reducir el esquema anterior a una formulación más simple [1]. La primera de ellas es la propuesta originalmente por Michaelis y Menten, y se le conoce como la suposición de equilibrio rápido. Consiste en suponer que el enlace y desenlace del sustrato a la enzima procede en equilibrio, mientras que la disociación en producto ocurre mucho más rápido. La segunda aproximación fue introducida en 1926 por Briggs y Haldane y se le denomina suposición de estado estacionario. En lugar de suponer un estado de equilibrio, se considera que el complejo enzima-sustrato alcanza rápidamente el estado estacionario. Esta suposición es menos restrictiva que la de equilibrio rápido. Todas las leyes de velocidad de reacción pueden ser deducidas a partir de cualquiera de estas dos consideraciones, sin embargo debido a que la matemática es más simple con la de equilibrio rápido, es la opción que se utiliza para describir muchos mecanismos complejos en los que intervienen fenómenos de cooperatividad, alostería y expresión genética, por ejemplo.

Consideración de equilibrio rápido:

Para la reacción reversible del enlace del sustrato a la enzima:



La constante de equilibrio es:

$$K_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{E S}{ES^*} \text{---- (2.7)}$$

La concentración total de la enzima es la suma de la enzima libre y la que se encuentra formando el complejo:

$$E_{total} = E + ES^* = K_{eq} \frac{ES^*}{S} + ES^* = ES^* \left(1 + \frac{K_{eq}}{S}\right) \text{---- (2.8)}$$

por lo tanto la concentración del complejo es:

$$ES^* = \frac{E_{total} S}{K_{eq} + S} \text{---- (2.9)}$$

Bajo estas condiciones la velocidad de reacción queda limitada por la rapidez de liberación del producto, por lo que se puede escribir:

$$r = v_{reacción} = k_2 ES^* = \frac{k_2 E_{total} S}{K_{eq} + S} = \frac{v_{max} S}{K_M + S} \quad (2.10)$$

Este modelo matemático corresponde a una combinación entre una cinética de primer orden a bajas concentraciones ($S \ll K_M$) y una cinética de orden cero a altas concentraciones ($S \gg K_M$):

$$r = \frac{v_{max} S}{K_M + S} \quad (2.11)$$

En esta ecuación, r es la rapidez de reacción volumétrica, $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$; S es la concentración de sustrato en mol m^{-3} , K_M es la constante de Michaelis y v_{max} es la máxima rapidez de reacción.

Esta aproximación, de equilibrio rápido, permite modificar el modelo matemático de manera relativamente sencilla. Por ejemplo, si una segunda molécula (I) se enlaza a algunos de los sitios activos de la enzima para formar otro complejo (EI), a la cual el sustrato no se puede enlazar, la molécula I actuaría como inhibidor, compitiendo por los sitios activos con el sustrato. El conjunto complejo de estados en los que se encontraría la enzima incluiría la enzima libre, E , el complejo enzima-sustrato (ES) y el complejo con la segunda molécula (EI):

$$E_{total} = E + ES + EI \quad (2.12)$$

Denotando a las constantes del equilibrio de formación de los complejos ES y EM como K_1 y K_2 , respectivamente, la rapidez de reacción puede expresarse como:

$$r = \frac{k_2 ES^*}{E + ES^* + EI} E_{total} = \frac{k_2 \left(\frac{ES}{K_1}\right)}{E + \left(\frac{ES}{K_1}\right) + \left(\frac{EI}{K_2}\right)} E_{total} = \frac{\frac{k_2 S}{K_1}}{1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_2}} E_{total} \quad (2.13)$$

Como puede verse, esta formulación puede ser fácilmente sistematizada pues permite una interpretación directa del denominador, donde puede visualizarse la distribución de la enzima entre sus diferentes estados, libre y complejados.

2.4 Consideración de estado estacionario.

Briggs y Haldane [1, 2] introdujeron la hipótesis de que el complejo enzima-sustrato alcanza rápidamente el régimen estacionario. En la resolución de las ecuaciones diferenciales ordinarias resultantes de la aplicación de la ley de acción de masas (Figura 2.2), la concentración del complejo enzima-sustrato rápidamente alcanza un régimen estacionario y permanece ahí hasta que el nivel de sustrato declina. Entonces la rapidez de cambio del complejo ES , es cero:

$$\frac{dES^*}{dt} = k_1 ES - k_{-1} ES^* - k_2 ES^* = 0 \quad (2.14)$$

La concentración total de enzima es: $E_{total} = E_{libre} + ES^*$, mientras que la concentración de substrato, asumiendo $P = 0$, es $S_{total} = S_{libre} + ES^* = S + ES^*$.

Para simplificar el álgebra se supone $S_{total} \gg ES^*$, de manera que $S_{libre} \sim S_{total}$. Esta consideración también asegura que la suposición de estado estacionario sea válida. Específicamente, la hipótesis de régimen estacionario es razonable si $S_0 + K_M \ll E_0$. A partir de estas consideraciones, la concentración del complejo es:

$$ES = \frac{E_{total} S}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S} \quad \text{--- (2.15)}$$

Tomando en cuenta que la rapidez de reacción es $r = k_2 ES^*$, y denominando el cociente de constantes en el denominador como K_M , constante de Michaelis, se obtiene:

$$r = \frac{k_2 E_{total} S}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S} = \frac{v_{max} S}{K_M + S} \quad \text{--- (2.16)}$$

Si se asume que la disociación del complejo ES^* en producto y enzima es lenta, de manera que k_2 sea mucho más pequeña que k_{-1} , entonces $(k_{-1} + k_2)/k_1$ es igual a K_{eq} , la constante del equilibrio de complejación. Bajo esta consideración, la aproximación de estado estacionario es equivalente a la de equilibrio rápido. Al graficar esta ecuación para r en términos de S , se obtiene una hipérbola rectangular. Como la que se muestra en la siguiente figura 2.3.

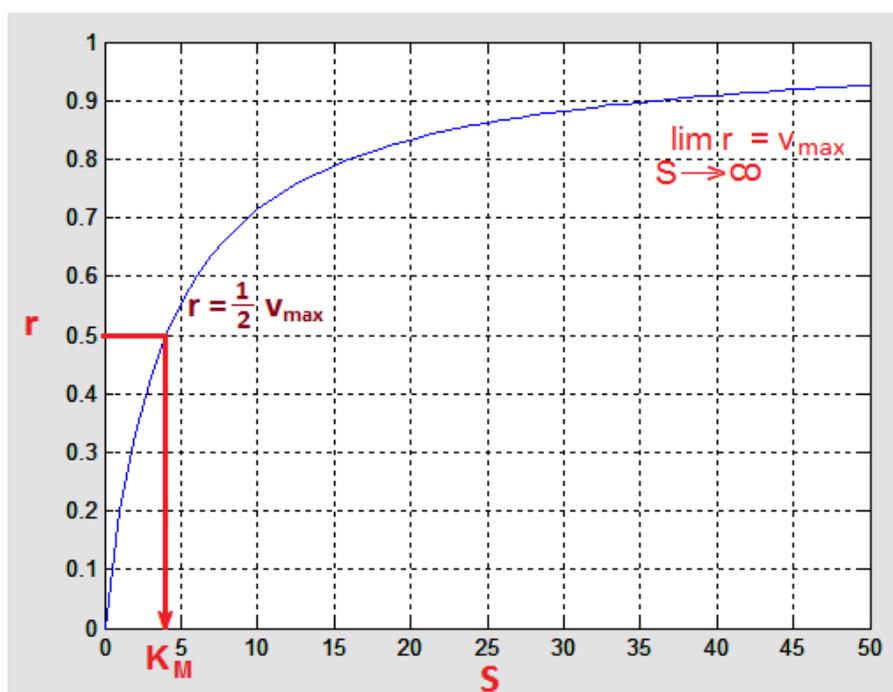


Figura 2.3. Evolución de la concentración de las diferentes especies dentro de un reactor batch perfectamente agitado para cinética de Michaelis-Menten

Obsérvese que cuando la concentración de sustrato es igual a la constante de Michaelis, la rapidez de reacción es igual a un medio de la velocidad máxima; además, la velocidad de reacción tiende asintóticamente a la rapidez máxima cuando la concentración de sustrato tiende a infinito. Si se grafica $(K_M + S)$ en el eje de las abscisas, y $(v_{max} - r)$ en las ordenadas, al substituir $K_M v_{max}$ por c , se obtiene $xy = c$, que es la expresión de una hipérbola equilátera, como puede observarse en la figura 2.4. Cuando los resultados experimentales se ajustan a este comportamiento, es evidente que el mecanismo de reacción es dominado por una cinética de Michaelis.

El siguiente programa permite obtener las gráficas de las figuras 2.3 y 2.4:

```
function michaelismenten3
%gráfica velocidad vs concentración de sustrato
clear all;close all;clc;
Km=4; %constante de Michaelis
S(1:51)=(0:50);% concentración inicial de sustrato
vmax=1;%rapidez máxima de reacción
r(1:51)=0;%dimensionamiento del vector de velocidad de reacción
x(1:51)=0;%dimensionamiento vector de abscisa de la gráfica
y(1:51)=0;%dimensionamiento vector ordenada de la gráfica
c=Km*vmax;%constante de la hipérbola equilátera
for i=1:51
    r(i)=vmax*S(i)/(Km+S(i));%rapidez de reacción
    x(i)=Km+S(i); % abscisa de la gráfica
    y(i)=(vmax-r(i))/c;% ordenada de la gráfica
end
plot (S,r,'-');grid on;
figure (2)
plot (x,y,'-');grid on;
```

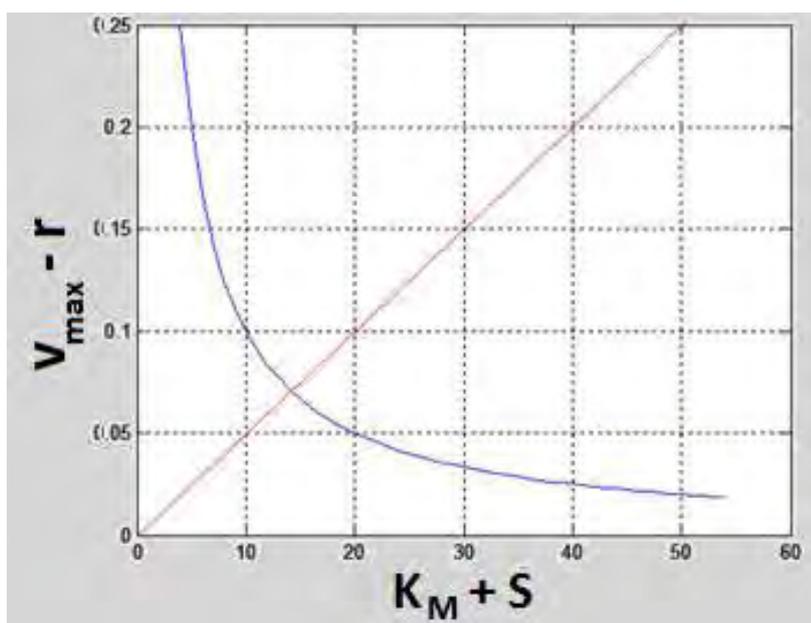


Figura 2.4 Gráfica que permite comprobar si una reacción enzimática sigue la cinética de Michaelis-Menten

2.5 Cinética de Michaelis-Menten para reacciones reversibles

La derivación de la cinética de Michaelis-Menten para reacciones irreversibles es un ejemplo ilustrativo, sin embargo no es un modelo muy apegado a la realidad debido a que no considera explícitamente la concentración del producto. En experimentos in vitro, la medición de la rapidez de reacción al principio, cuando hay muy poco producto, no genera problemas, pero en situaciones in vivo, o en varias de las aplicaciones industriales, es diferente. En cualquier trayectoria metabólica, el producto debe estar presente para asegurar el siguiente paso del mecanismo. Esto significa que siempre habrá algún grado de inhibición o reversibilidad debida al producto, y para formular los modelos matemáticos correspondientes es necesario incluir la reversibilidad de forma explícita.

La formulación de la ecuación reversible de Michaelis-Menten es muy semejante a la del caso irreversible. Ahora debe considerarse, en el caso de la formación de producto, las velocidades de reacción tanto en sentido directo (con coeficiente cinético k_1) como inverso (con coeficiente cinético k_{-2}):

$$r = r_f - r_r = k_1 ES - k_{-2} EP \quad (2.17)$$

La ecuación que describe la concentración del complejo ES en estado estacionario tiene ahora un término adicional correspondiente al enlace del producto con la enzima libre para volver a formar el complejo. Tomando en cuenta esto, se obtiene la siguiente expresión general de cinética enzimática reversible:

$$r = \frac{v_f \frac{S}{K_S} - v_r \frac{P}{K_P}}{1 + \frac{S}{K_S} + \frac{P}{K_P}} \quad (2.18)$$

Donde v_f y v_r son las velocidades máximas en sentido directo e inverso, mientras que los valores de K_S y K_P son los coeficientes de Michaelis para sustrato y producto, respectivamente. En el equilibrio la rapidez de reacción reversible, r , es cero, con una constante de equilibrio $K_{eq} = P/S$; r será positiva si la reacción procede hacia formación de productos y negativa si favorece la dirección inversa. Si se considera $P=0$, esta ecuación se convierte en la formulación de la cinética irreversible de Michaelis-Menten.

El siguiente algoritmo de cómputo permite calcular las concentraciones de todas las especies para una cinética de Michaelis-Menten con reacción reversible en el paso de la disociación del complejo enzima-sustrato para formar el producto, utilizando el método de Runge-Kutta.

function bioreactorbatchmmrev

% biorreactor cstr balances hechos con base en horas

clear all; close all; clc;

kmas=4;kmenos=1;kmenos2=1/2;%parámetros cinéticos para reacción reversible

k2=.5;%parámetros cinéticos para reacción irreversible

```

S0=5;E0=2;%concentración inicial de sustrato y enzima
ES=0;P=0;S=S0;E=E0;%condiciones iniciales
deltat=.0001;nit=50000;%parámetros de la simulación
for i=1:nit
    t = (i-1)*deltat;
    % método de Runge-Kutta
    rs1=-kmas*E*S; %rapidez de reacción de sustrato 1er paso Runge-Kutta
    re1=-kmas*E*S+k2*ES; %rapidez de reacción de enzima 1er paso Runge-Kutta
    res1=kmas*E*S-kmenos*ES-k2*ES; %rapidez de reacción de complejo 1er paso R-K
    rp1=k2*ES-kmenos2*P; %rapidez de reacción de producto 1er paso Runge-Kutta
    cs1=rs1/2*deltat+S; %concentración sustrato 1er paso Runge-Kutta
    ce1=re1/2*deltat+E; %concentración enzima 1er paso Runge-Kutta
    ces1=res1/2*deltat+ES; %concentración complejo ES 1er paso Runge-Kutta
    cp1=rp1/2*deltat+P; %concentración producto 1er paso Runge-Kutta
    rs2=-kmas*ce1*cs1; %rapidez de reacción de sustrato 2o paso Runge-Kutta
    re2=-kmas*ce1*cs1+k2*ces1; %rapidez de reacción de enzima 2o paso Runge-Kutta
    res2=kmas*ce1*cs1-kmenos*ces1-k2*ces1;%rapidez de reacción complejo 2o paso R-K
    rp2=k2*ces1-kmenos2*cp1; %rapidez de reacción de producto 2o paso Runge-Kutta
    cs2=rs2/2*deltat+cs1; %concentración de sustrato 2o paso Runge-Kutta
    ce2=re2/2*deltat+ce1; %concentración de enzima 2o paso Runge-Kutta
    ces2=res2/2*deltat+ces1; %concentración de complejo ES 2o paso Runge-Kutta
    cp2=rp2/2*deltat+cp1; %concentración de producto 2o paso Runge-Kutta
    rs3=-kmas*ce2*cs2; %rapidez de reacción de sustrato 3er paso Runge-Kutta
    re3=-kmas*ce2*cs2+k2*ces2; %rapidez de reacción enzima 3er paso Runge-Kutta
    res3=kmas*ce2*cs2-kmenos*ces2-k2*ces2;%rapidez reacción de complejo 3er paso RK
    rp3=k2*ces2-kmenos2*cp2; %rapidez de reacción de producto 3er paso Runge-Kutta
    cs3=rs3/2*deltat+cs2; %concentración de sustrato 3er paso Runge-Kutta
    ce3=re3/2*deltat+ce2; %concentración de enzima 3er paso Runge-Kutta
    ces3=res3/2*deltat+ces2; %concentración de complejo ES 3er paso Runge-Kutta
    cp3=rp3/2*deltat+cp2; %concentración de producto 3er paso Runge-Kutta
    rs4=-kmas*ce3*cs3; %rapidez de reacción de sustrato 4o paso Runge-Kutta
    re4=-kmas*ce3*cs3+k2*ces3; %rapidez de reacción de enzima 4o paso R-K
    res4=kmas*ce3*cs3-kmenos*ces3-k2*ces3; %rapidez de reacción complejo 4o paso RK
    rp4=k2*ces3-kmenos2*cp3; %rapidez de reacción de producto 4o paso Runge-Kutta
    S=S+1/6*(rs1+2*rs2+2*rs3+rs4)*deltat; %concentración de sustrato
    E=E+1/6*(re1+2*re2+2*re3+re4)*deltat; %concentración de enzima
    ES=ES+1/6*(res1+2*res2+2*res3+res4)*deltat; %concentración de complejo ES
    P=P+1/6*(rp1+2*rp2+2*rp3+rp4)*deltat; %concentración de producto
    S=S/(S+P+ES)*S0;P=P/(S+P+ES)*S0;%normalización sustrato y producto
    E=E/(E+ES)*E0;ES=ES/(ES+E)*E0;%normalización enzima y complejo ES
    contar = i/500;
    if ((contar-ceil(contar))==0)
        figure (1) %desplegado gráfico
        plot (t,S,'.'); hold on;grid on;plot (t,E,'.r');hold on;grid on;
        plot (t,ES,'.g');hold on;grid on;plot (t,P,'.m');hold on;grid on;
    else
        end
    end
end

```

El resultado de la ejecución de este programa es el siguiente:

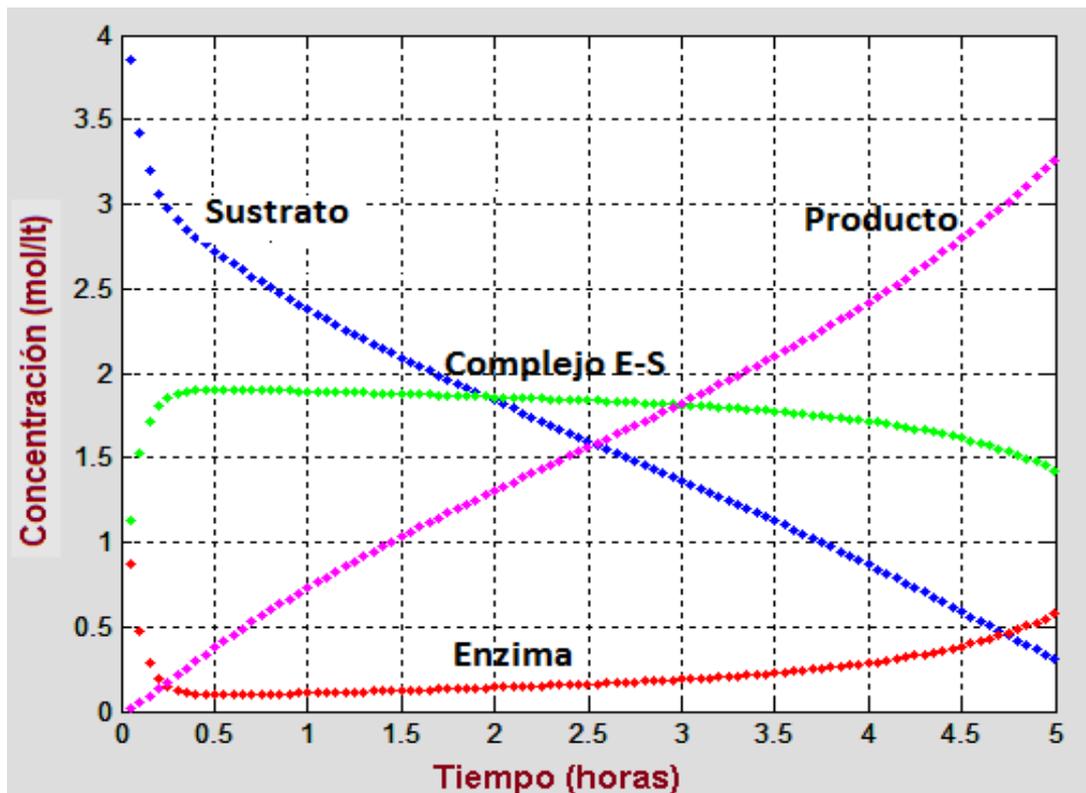


Figura 2.5 Evolución de la concentración de todas las especies para cinética de Michaelis-Menten con paso reversible en la disociación del complejo enzima-substrato.

El comportamiento es muy parecido al caso en el que la disociación del complejo E-S es irreversible, pero puede observarse que se ha ampliado el lapso de tiempo en el que la concentración del complejo enzima-substrato, así como la concentración de la enzima, permanecen constantes, en comparación con lo observado en la figura 2.2. También se puede notar que tarda más tiempo en crecer la concentración de la enzima hasta su valor inicial.

2.6 Reactores batch enzimáticos con inhibición competitiva y no competitiva

Existen moléculas capaces de retardar o acelerar la actividad catalítica de una enzima; a ellas se les denomina inhibidores y activadores, respectivamente.

Un tipo de inhibición muy frecuente es la inhibición competitiva, que ocurre cuando el inhibidor es estructuralmente similar al sustrato y por lo tanto compite por los sitios activos formando un complejo terminal. Sin embargo no es el único tipo de inhibición.

2.6.1 Inhibidores:

Los inhibidores se clasifican en dos categorías, reversibles e irreversibles. Un ejemplo de inhibición reversible es la inhibición competitiva, debido a que el inhibidor se enlaza reversiblemente a la enzima; este tipo de inhibición puede ser evitado añadiendo un exceso de sustrato. Los inhibidores irreversibles se enlazan covalentemente a la enzima o la modifican químicamente, provocando un cambio permanente.

2.6.2 Modelo generalizado para el fenómeno de inhibición

El inhibidor puede interactuar con una enzima en tres formas diferentes:

- Enlazándose a un sitio activo
- Enlazándose a un sitio alternativo en la proteína
- Enlazándose al sustrato que está unido al sitio activo

Tomando en cuenta estas alternativas, Botts y Morales [4] formularon un modelo cinético generalizado que describe el enlace químico reversible del inhibidor (I) ya sea a la enzima libre (E) o al complejo enzima-sustrato (ES), o al complejo enzima-inhibidor (EI), o al complejo enzima-sustrato-inhibidor (ESI); suponiendo que los complejos ES y ESI puedan ser catalíticamente activos. La figura siguiente representa la ruta química de las formas en que actúan los inhibidores enzimáticos:

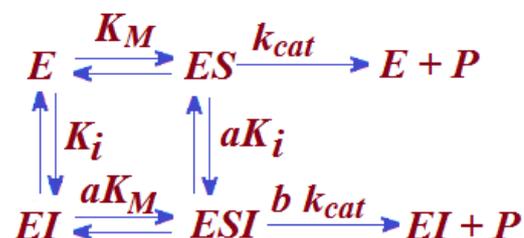


Figura 2.6 Esquema Generalizado de Inhibición Enzimática

A cada paso de este mecanismo le puede corresponder un diferente orden de reacción, obteniéndose distintos modelos matemáticos. En su expresión generalizada, Botts y Morales [4] consideraron equilibrios rápidos. La constante catalítica k_{cat} suele ser diferente para la transformación de ES o ESI en producto. Dicha diferencia se toma en cuenta con el factor b . Si $b=1$, entonces ES y ESI tienen igual actividad catalítica. Si $b=0$, entonces sólo el complejo ES puede formar producto. Nótese que si $b>1$ el complejo ESI es más activo que el complejo ES . Bajo estas condiciones, el inhibidor actúa como activador. Para que actúe como un verdadero inhibidor, b debe tener un valor en el intervalo $0 \leq b \leq 1$.

En el esquema generalizado, K_i representa a la constante de disociación de enlace. Mientras más grande sea esta constante, menos favorable es la formación de los complejos involucrados. El factor a representa la diferencia en afinidades de enlace

entre el sustrato con el complejo EI y el inhibidor con el complejo ES . Si $a = 1$, no hay diferencia. Cuando $a = 0$, solamente el inhibidor se puede enlazar a la enzima libre. Modificando a y b se pueden obtener todos los modelos de inhibición y de activación comunes. Aplicando ley de acción de masas, el modelo correspondiente a la rapidez de reacción para el esquema de inhibición generalizado es:

$$r = \frac{V_m \frac{S}{K_m} (1 + b \frac{I}{aK_i})}{1 + \frac{S}{K_m} + \frac{I}{K_i} + \frac{SI}{aK_i K_m}} \quad (2.19)$$

Una forma alternativa muy útil de escribir esta ecuación es:

$$r = \frac{V_m S (1 + b \frac{I}{aK_i})}{K_m (1 + \frac{I}{K_i}) + S (1 + \frac{I}{aK_i})} \quad (2.20)$$

En tanto que para el caso reversible se tiene:

$$r = \frac{\frac{V_m}{K_s} (S - \frac{P}{K_{eq}}) (1 + b \frac{I}{aK_i})}{(1 + \frac{S}{K_s} + \frac{P}{K_p}) + \frac{I}{K_i} (1 + \frac{S}{aK_s} + \frac{P}{aK_p})} \quad (2.21)$$

Estas ecuaciones generalizadas pueden ser simplificadas introduciendo diferentes consideraciones, lo cual permite obtener modelos matemáticos para varios patrones de inhibición específicos. Los mecanismos más comúnmente descritos en los libros de texto son la inhibición competitiva y la no competitiva. En la práctica la inhibición no competitiva es muy rara mientras que la competitiva es muy frecuente.

2.6.3 Inhibición competitiva

Considerando $a \gg 0$ y $b=0$, el esquema generalizado se reduce a:

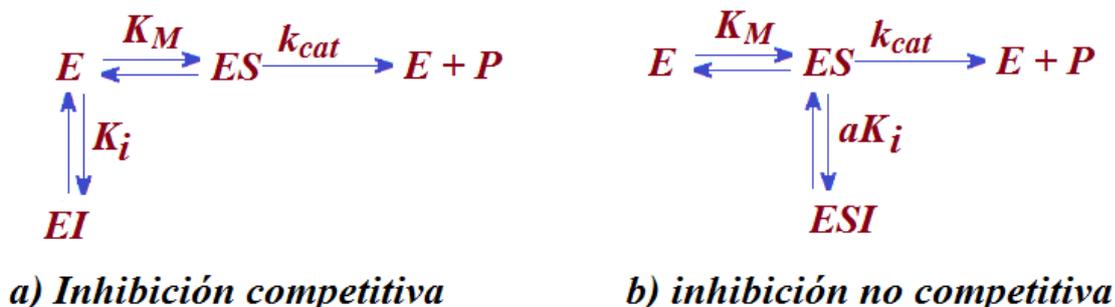


Figura 2.7 Tipos de inhibición

El mecanismo cinético para un único inhibidor competitivo se muestra en el inciso (a) de la figura 2.6. Haciendo que el factor a sea grande ($a \gg 0$; $b=0$) la formación de ES puede eliminarse dejando solamente la interacción competitiva.

Si se incrementa la concentración de sustrato, es posible reducir la competencia del inhibidor. Aplicando nuevamente la ley de acción de masas, se obtiene la siguiente expresión cinética:

$$r = \frac{V_m S}{S + K_m (1 + \frac{I}{K_i})} = \frac{V_m S / K_m}{1 + \frac{S}{K_m} + \frac{I}{K_i}} \quad \text{--- (2.22)}$$

Con $I = 0$, esta ecuación de inhibición competitiva se reduce a la ecuación normal e irreversible de Michaelis-Menten. Nótese que el término $K_m (1 + I/K_i)$ en la primera ecuación muestra claramente el impacto del inhibidor, I , sobre la constante de Michaelis, K_M ; y que el inhibidor no causa efecto sobre V_m .

El siguiente algoritmo de cómputo permite visualizar gráficamente el efecto de la concentración del agente inhibidor y de la concentración de sustrato sobre la rapidez de reacción, tomando en cuenta cuatro concentraciones de inhibidor diferentes, y además, $V_m=1$; $K_M=1$; $K_i=1$:

```
function inhiblevita
clear all; close all; clc;
logS(1:50)=0; %dimensionamiento vector de logaritmo de la concentración de sustrato
logr(1:50)=0; %dimensionamiento vector de logaritmo de la rapidez de reacción
I(1)=0;I(2)=1;I(3)=5;I(4)=25; %diferentes concentraciones del inhibidor
Vm=1; %rapidez máxima de reacción
Km=1; %constante de Michaelis
Ki=1; %constante de Inhibición
for i=1:4
    for j=1:50
        logS(j)=-1+(j-1)*.1; %especificación logaritmo de concentración de sustrato
        S=10^(logS(j)); %cálculo concentración de sustrato
        r=Vm*S/(S+Km*(1+I(i)/Ki)); %cálculo concentración de sustrato
        logr(j)=log(r);
    end
end
%desplegado gráfico
axis([-1 3 -2 0]);
plot (logS,logr,'-');hold on;
xlabel('log (Concentración de Sustrato)')
ylabel('log (velocidad de reacción)')
title('Cinética de Inhibición Competitiva')
grid on;
end
```

El desplegado gráfico que se obtiene al ejecutar este programa se presenta a continuación:

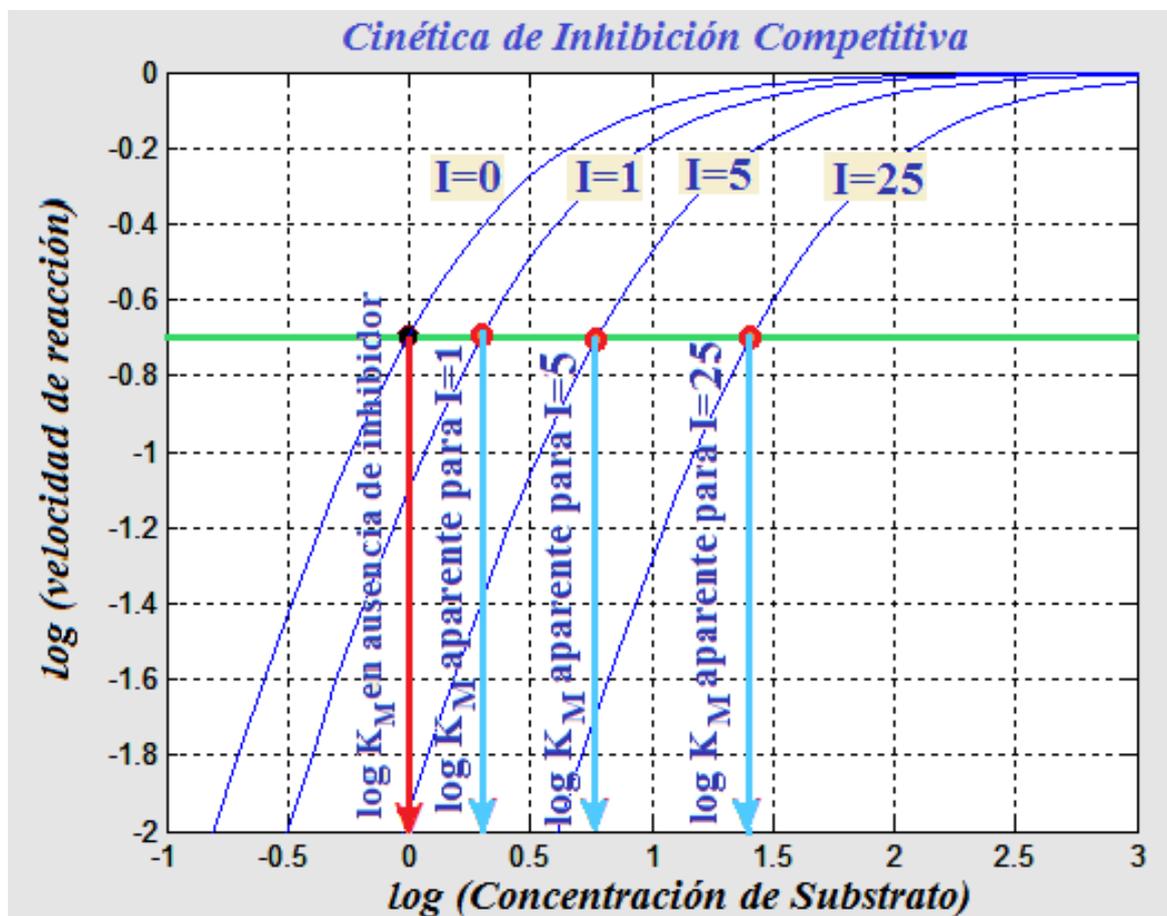


Figura 2.8 Inhibición Competitiva. Efecto de la concentración del inhibidor sobre la rapidez de reacción.

La figura anterior muestra cómo cambia la velocidad de reacción en respuesta a cambios en la concentración de sustrato, imponiendo una concentración constante del inhibidor para cada caso. Se señalan en el eje de las abscisas las constantes aparentes de Michaelis–Menten para resaltar el efecto del inhibidor y para que sea más fácil comparar con otros esquemas de inhibición. Las cuatro curvas de la figura alcanzan la velocidad de reacción máxima bajo concentración suficiente de S (10^3 M).

En ausencia de inhibidor ($I=0$) el logaritmo de la concentración de sustrato corresponde a la constante de Michaelis-Menten; mientras que para diferentes valores de la concentración del inhibidor, las constantes aparentes se obtienen gráficamente de la manera indicada en la figura 2.8.

2.6.4 Dinámica de un reactor enzimático batch con inhibición competitiva irreversible

La inhibición competitiva irreversible es muy común en aplicaciones prácticas de la Ingeniería en Alimentos.

La evolución de las concentraciones de reactivo y producto, cuando este tipo de reacción enzimática se efectúa dentro de un biorreactor tipo batch perfectamente agitado, puede calcularse mediante un algoritmo de cómputo como el que se presenta a continuación, basado en el método de Euler:

```
function inhibevita
clear all; close all; clc; nit=30;
I(1)=0; I(2)=1; I(3)=5; I(4)=25; %Diferentes concentraciones del inhibidor
Vm=1; %Rapidez máxima de reacción
Km=1; %Constante de Michaelis
Ki=1; % Constante de Inhibición
S(1:nit)=0; %Dimensionamiento vector de concentración del sustrato
P(1:nit)=0; %Dimensionamiento vector de concentración del producto
t(1:nit)=0; %Dimensionamiento vector tiempo
dt=.1; %paso de tiempo
S(1)=1; %Concentración inicial de sustrato
P(1)=0; %Concentración inicial de producto
for i=1:4
    t(j)=(j-1)*dt; %cálculo de los diferentes tiempos
    for j=2:nit
        r=Vm*S/(S+Km*(1+I(i)/Ki)); %cálculo de la rapidez de reacción
        S(j)=S(j-1)-r*dt; %cálculo de concentración sustrato
        P(j)=P(j-1)+r*dt; %cálculo de concentración de producto
    end
    % desplegado gráfico
    plot (t,S, '-'); hold on; plot (t,P, '-r'); hold on;
    xlabel ('tiempo, segs'); ylabel('concentración (M)')
    title ('Evolución de concentración de sustrato y producto');
    grid on; pause;
end
```

Los resultados de la ejecución de este programa, en el cual se toman en cuenta cuatro diferentes concentraciones de inhibidor y coeficientes cinéticos unitarios, se presentan en la siguiente gráfica:

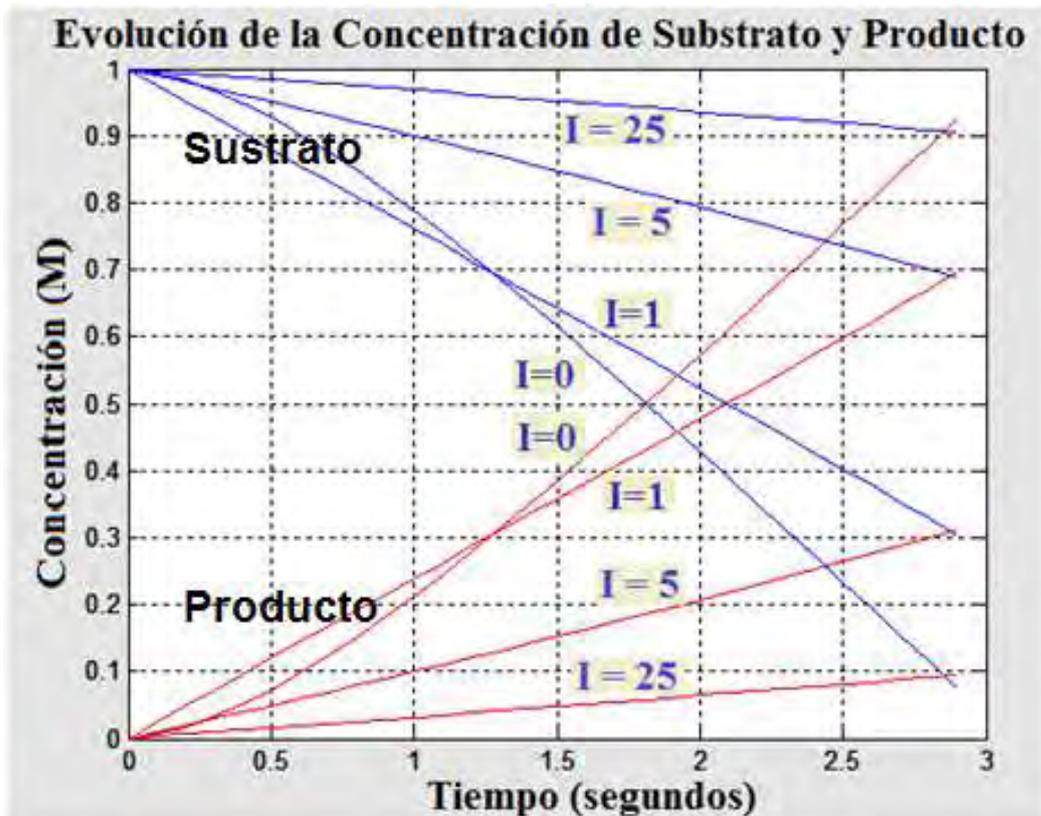


Figura 2.9 Evolución de concentración de sustrato y producto en un reactor Batch para inhibición competitiva irreversible.

Puede observarse el efecto de la concentración del inhibidor; a altas concentraciones del inhibidor el avance de reacción es pobre; en ausencia del inhibidor se obtiene el máximo avance de reacción. En la literatura científica existe una gran cantidad de artículos donde se reportan los parámetros cinéticos para sistemas de este tipo con aplicación en la industria de alimentos.

2.6.5 Dinámica de un biorreactor batch con inhibición competitiva reversible

La forma reversible de la cinética con inhibición competitiva puede derivarse de la ecuación generalizada, especificando $a \gg 1$ y $b = 0$ obteniéndose:

$$r = \frac{V_m \left(S - \frac{P}{K_{eq}} \right)}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{P}{K_p} + \frac{I}{K_i}} \quad \text{--- (2.23)}$$

Puede observarse que la velocidad de reacción depende de la concentración del producto, la cual varía durante el transcurso de la reacción. El siguiente algoritmo basado en el método de Euler, permite describir la dinámica de un reactor Batch para la inhibición competitiva reversible de una reacción enzimática:

```

function inhibcomprevevita
clear all;close all;clc;nit=1000; %número total de iteraciones
I(1)=2;I(2)=5;I(3)=10;I(4)=20;%diferentes valores de concentración del inhibidor
S(1:nit)=0; %dimensionamiento del vector de concentración de sustrato
P(1:nit)=0; %dimensionamiento del vector de concentración de producto
Vm=1; %rapidez de reacción máxima
Ki=1; %constante de inhibición
Ks=1/2; %constante de inhibición por parte del sustrato
Keq=2; %constante de equilibrio para la inhibición competitiva reversible
Kp=1; %coeficiente de inhibición por parte del producto
t(1:nit)=0; %dimensionamiento del vector de tiempo
dt=.01; %paso de tiempo
for i=1:4
    S(1)=1; %especificación de la concentración inicial de sustrato
    P(1)=0; %especificación de la concentración inicial de producto
    for j=2:nit
        t(j)=(j)*dt; %especificación de tiempo de cálculo
        %cálculo de la rapidez de reacción
        v=Vm/Ks*(S(j-1)-P(j-1)/Keq)/(1+S(j-1)/Ks+P(j-1)/Kp+I(i)/Ki);
        S(j)=S(j-1)-v*dt;%Evolución de la concentración del sustrato
        P(j)=P(j-1)+v*dt; %Evolución de la concentración del producto
    end
    plot (t,S,'.');hold on; plot (t,P,'.r');hold on;
    xlabel ('tiempo, segs'); ylabel('concentración (M)')
    title ('Evolución de concentración de sustrato y producto'); grid on;pause (1);
end

```

La figura 2.10 muestra los resultados de la ejecución de este programa, utilizando valores de la constante de equilibrio de 1 y 2, y todos los demás parámetros unitarios, excepto $K_S = 1/2$. Obsérvese que existe una tendencia asintótica de la concentración del sustrato y del producto al valor de $1/2$ cuando $K_{eq}=1$, mientras que la tendencia es hacia $1/3$ para el sustrato y $2/3$ para el producto, cuando $K_{eq} = 2$.

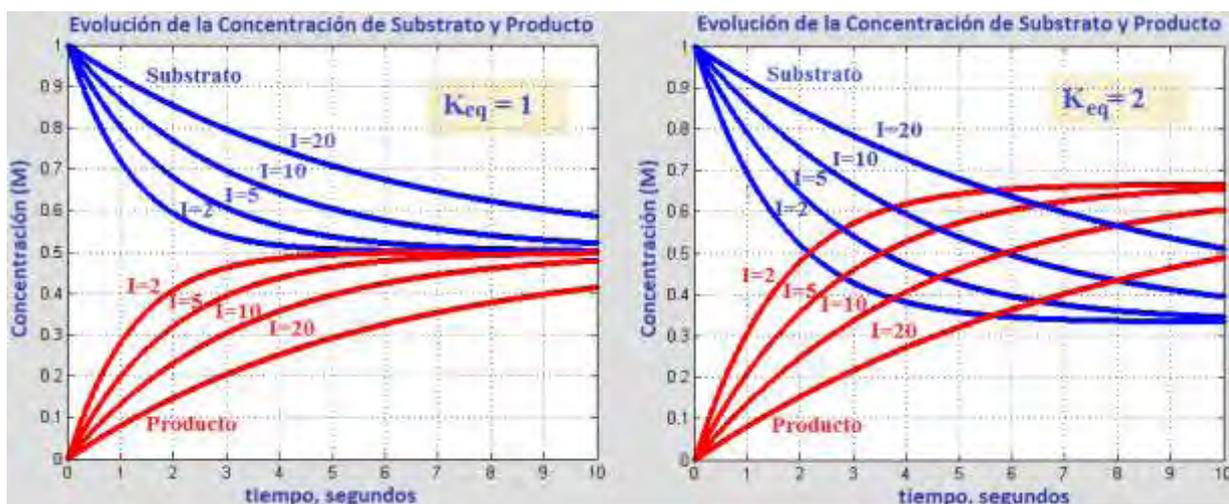


Figura 2.10 Evolución de las concentraciones de sustrato y producto en un reactor Batch para reacción competitiva reversible

2.6.6 Inhibición por parte del producto

A veces algunas reacciones parecen irreversibles, es decir, no se detecta ninguna velocidad inversa discernible, y sin embargo, la reacción directa es influenciada por la acumulación del producto. Este efecto es causado por la competencia entre producto y sustrato por unirse al sitio activo, a lo que se le denomina inhibición por parte del producto. Un ejemplo industrial de esto, es la conversión de lactosa a galactosa por la enzima β -galactosidasa. Donde la galactosa compite con la lactosa, disminuyendo la velocidad hacia la formación del producto.

Para describir la inhibición irreversible por parte del producto, se puede establecer que P/K_{eq} en la ecuación generalizada es igual a cero. Esto da como resultado:

$$r = \frac{V_m S}{S + K_m \left(1 + \frac{P}{K_p}\right)} \quad (2.24)$$

Conforme aumenta la concentración de producto, él compite con el sustrato y por lo tanto ralentiza la reacción. Esta ecuación tiene exactamente la misma forma que la de inhibición competitiva. La figura 2.11 muestra el efecto de K_p sobre la evolución de las concentraciones de sustrato y producto dentro de un reactor Batch, para un valor de $K_M = 1$. El algoritmo de cómputo que permite obtener esta gráfica es el siguiente:

```
function inhibporpartedelprod
clear all; close all; clc; nit=1000; %número total de iteraciones
%diferentes valores de la constante de inhibición por parte del producto
Kp(1)=.01; Kp(2)=.1;Kp(3)=1;Kp(4)=10;
S(1:nit)=0; %dimensionamiento del vector concentración de sustrato
P(1:nit)=0; %dimensionamiento del vector concentración de producto
Vm=1; %rapidez de reacción máxima
Km=1; %constante de Michaelis
t(1:nit)=0; %dimensionamiento del vector tiempo
dt=.01; %paso de tiempo
for i=1:4
    S(1)=1; %concentración inicial de sustrato
    P(1)=0; %concentración inicial del producto
    for j=2:nit
        t(j)=(j)*dt; %especificación del tiempo
        % cálculo de la rapidez de reacción
        v=Vm*S(j-1)/(S(j-1)+Km*(1+P(j-1)/Kp(i)));
        S(j)=S(j-1)-v*dt; %evolución de la concentración de sustrato
        P(j)=P(j-1)+v*dt;%evolución de la concentración de producto
    end
plot (t,S,'.');hold on; plot (t,P,'.r');hold on;
xlabel ('tiempo, segs'); ylabel('concentración (M)')
title('Evolución de concentración de sustrato y producto');grid on;pause (1);
end
```

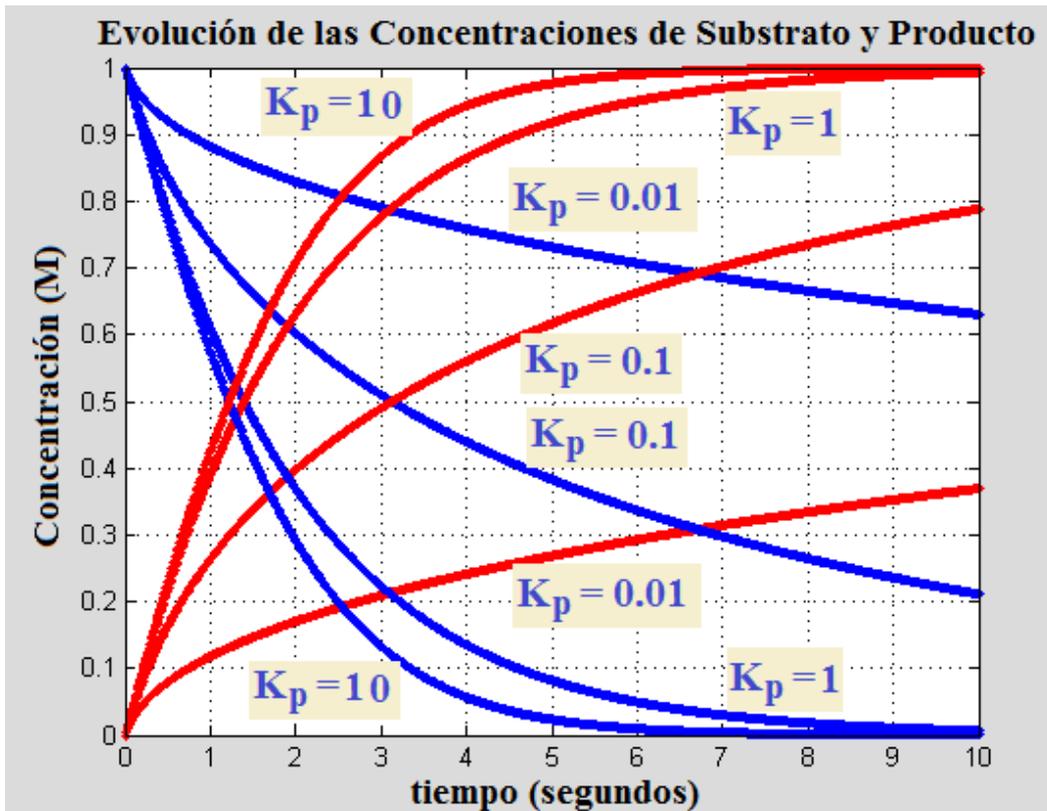


Figura 2.11 Variación de las concentraciones de Sustrato y Producto dentro de un reactor Batch para reacciones enzimáticas con inhibición por parte del producto

Como ya se mencionó, el aumento de la concentración de producto ralentiza la reacción, tal efecto es más marcado mientras es menor el valor de K_p .

La inhibición competitiva también puede ocurrir si una enzima se enfrenta a sustratos con estructura similar. Sustratos relacionados tienen el potencial de unirse al sitio activo y bloquear el enlace del sustrato de interés.

2.6.7 Inhibición no competitiva

La inhibición no competitiva ocurre cuando un inhibidor se enlaza al sustrato únicamente cuando ya dicho sustrato se ha unido a la enzima, figura 2.7 (b). Se podría hipotetizar que el enlazamiento del sustrato a la enzima provoca un cambio conformacional que permite que el inhibidor se una posteriormente. Esto puede involucrar ya sea un enlace a un sitio completamente separado o al sustrato enlazado a la enzima. En cualquier caso, el inhibidor no compite directamente con el sustrato por los sitios activos. Por lo tanto, al aumentar la concentración de sustrato, no se evita el enlace del inhibidor no competitivo.

En el esquema de Botts-Morales, se especifica $b=0$, y $a \rightarrow 0$, asumiendo además que K_i tiende a infinito. Esto significa que $K_i \gg aK_i$ y asegura que el enlace de I a E es muy raro que ocurra, mientras que el producto aK_i tiene un valor finito, por lo que I puede enlazarse a ES . Cuando se toman en cuenta estas consideraciones, se obtiene la siguiente expresión matemática para la inhibición no competitiva:

$$r = \frac{V_m S}{K_m + S \left(1 + \frac{I}{aK_i}\right)} \quad \text{--- (2.25)}$$

La figura 2.12 muestra como varían las concentraciones de sustrato y producto a diferentes concentraciones de inhibidor no competitivo, considerando $K_M = 1 = K_i = V_m$.

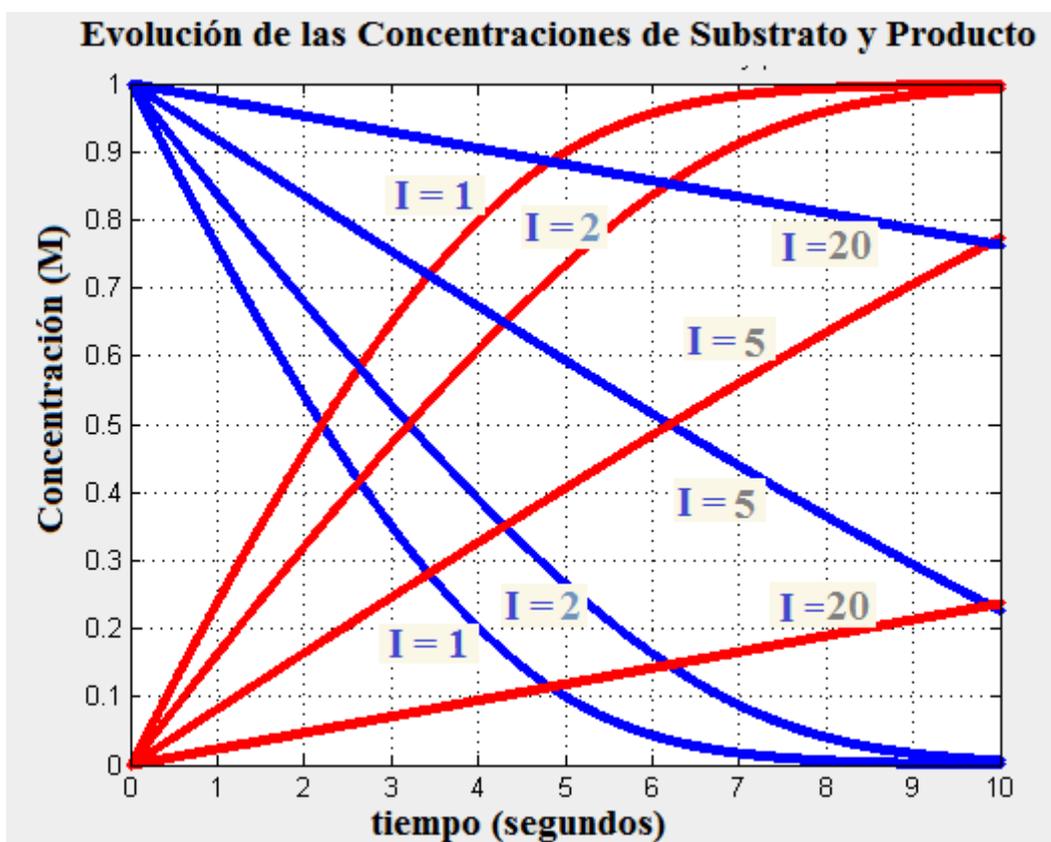


Figura 2.12 Evolución de las concentraciones de Sustrato y Producto para Inhibición no competitiva dentro de un reactor Batch

Puede observarse que conforme aumenta la concentración del inhibidor, la reacción es más lenta.

El algoritmo utilizado para los cálculos de la figura anterior es el siguiente:

```

function inhibnocompetitiva
clear all; close all;clc;
nit=1000; %número total de iteraciones
I(1)=1;I(2)=2;I(3)=5;I(4)=20; %diferentes valores de concentración de inhibidor
S(1:nit)=0; %dimensionamiento de concentración de sustrato
P(1:nit)=0; %dimensionamiento de concentración de producto
Vm=1; %rapidez máxima de reacción
Km=1; %Constante de Michaelis
Ki=1; %Constante de inhibición
t(1:nit)=0; %Dimensionamiento vector de tiempo
dt=.01; %paso de tiempo
a=.5; %coeficiente de Botts y Morales
for i=1:4
    S(1)=1; %Concentración inicial de sustrato
    P(1)=0; %Concentración inicial de producto
    for j=2:nit
        t(j)=(j)*dt; %especificación del tiempo
        %rapidez de reacción
        v=Vm*S(j-1)/(Km+S(j-1)*(1+I(i)/a/Ki));
        S(j)=S(j-1)-v*dt; %evolución de concentración de sustrato
        P(j)=P(j-1)+v*dt; %evolución de concentración de producto
    end
    %desplegado gráfico
    plot (t,S,'.');hold on; plot (t,P,'.r');hold on;
    xlabel ('tiempo, segs'); ylabel('concentración (M)')
    title ('Evolución de concentración de sustrato y producto')
    grid on;pause (1);
end

```

2.6.8 Inhibición no competitiva reversible

La forma reversible de la ley de velocidad no competitiva puede derivarse a partir de la ecuación (2.21), obteniéndose:

$$r = \frac{\frac{V_m}{K_s} \left(S - \frac{P}{K_{eq}} \right)}{1 + \left(\frac{S}{K_s} + \frac{P}{K_p} \right) \left(1 + \frac{I}{aK_i} \right)} \text{-----(2.26)}$$

Donde V_m es la velocidad máxima, K_s y K_p las constantes de saturación media del sustrato y del producto.

El siguiente programa permite calcular la evolución del perfil de las concentraciones de sustrato y producto para cuatro diferentes concentraciones del inhibidor, y los valores de las constantes especificados en el código:

```

function inhibnocompetitivarev

clear all; close all;clc;
nit=1000; %número total de iteraciones
I(1)=1;I(2)=2;I(3)=5;I(4)=20; %diferentes valores de concentración del inhibidor
S(1:nit)=0; %Concentración inicial del sustrato
P(1:nit)=0; %Concentración inicial del producto
Vm=1; %rapidez máxima de reacción
Ks=1; %Constante de inhibición por parte del sustrato
Kp=1; %Constante de inhibición parte del producto
Ki=1; %Constante de inhibición
t(1:nit)=0; %dimensionamiento de vector de tiempo
dt=.01; %paso de tiempo
a=.5; %coeficiente de Botts y Morales
Keq=1; %Constante de equilibrio para la inhibición no competitiva reversible

for i=1:4
    S(1)=1; %Concentración inicial de sustrato
    P(1)=0; %Concentración inicial de producto

    for j=2:nit
        t(j)=(j)*dt; %especificación de tiempo
        %cálculo de la rapidez de reacción
        v=Vm/Ks*(S(j-1)-P(j-1)/Keq)/(1+S(j-1)/Ks+P(j-1)/Kp)/(1+I(i)/a/Ki);

        S(j)=S(j-1)-v*dt;%evolución de la concentración de sustrato
        P(j)=P(j-1)+v*dt;%evolución de la concentración de producto
    end

    %desplegado gráfico
    plot (t,S,'-');hold on; plot (t,P,'-r');hold on;
    xlabel ('tiempo, segs'); ylabel('concentración (M)')
    title ('Evolución de concentración de sustrato y producto')
    grid on;pause (1);
end

```

Los resultados de la ejecución de este programa se muestran en la siguiente figura:

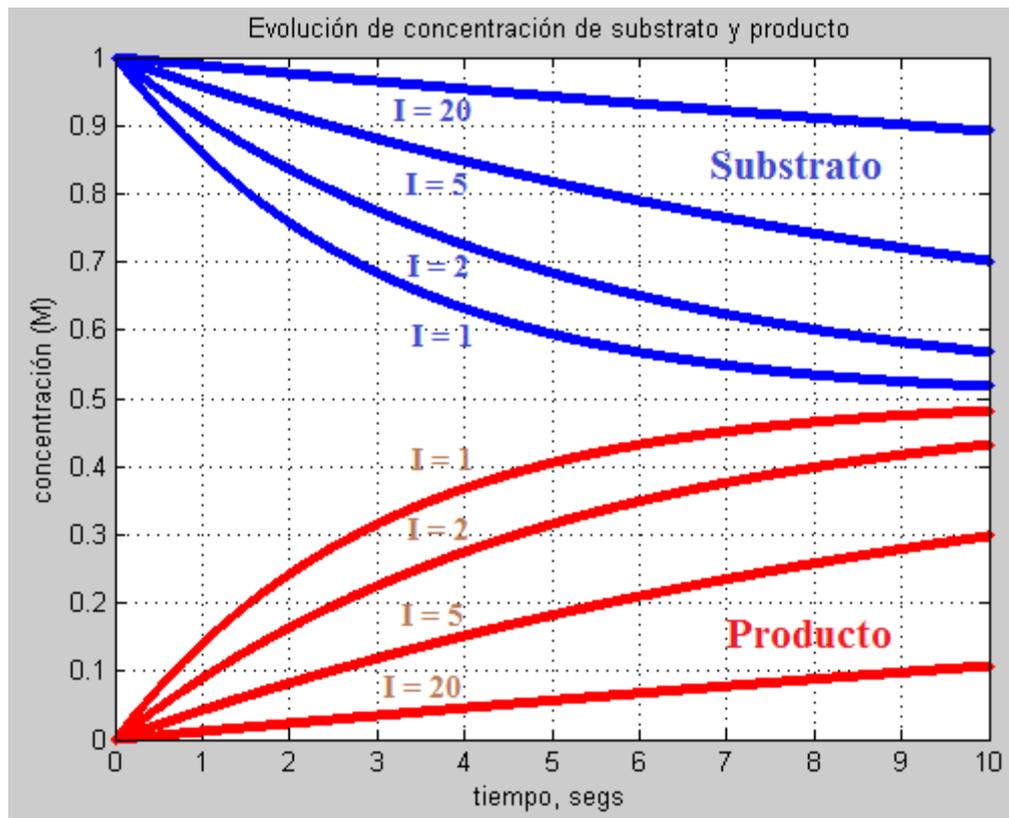


Figura 2.13 Evolución de las concentraciones de Sustrato y Producto para Inhibición no competitiva reversible dentro de un reactor Batch

Obsérvese que el efecto de la reversibilidad es ralentizar la reacción.

2.7 Alosterismo y cooperatividad

Alosterismo y cooperativismo son dos términos que frecuentemente se confunden, por lo que es necesario aclarar el concepto.

El término alosterismo proviene de dos vocablos griegos, allos que significa “otro” y estéreos que significa “sólido o forma”. Las enzimas alostéricas son las que adquieren otras formas, otra conformación, por la unión de moduladores [5]. Estos moduladores pueden ser inhibidores o activadores que se unen a la enzima en un sitio diferente al sitio activo e inducen un cambio conformacional en la estructura de la enzima tal que cambia la estructura del sitio activo. La inhibición no competitiva es una unión de un inhibidor a un sitio de la enzima diferente al de unión al sustrato e implica una variación en la V_{max} siendo la curva v vs $[S]$ una hipérbola. Sin embargo, un inhibidor alostérico también puede dar como resultado una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato y ser tratado en consecuencia como competitivo, aunque su estructura no sea semejante a la del sustrato. También pueden darse otro tipo de efectos como lo son un incremento en la afinidad o una activación. Muchas enzimas alostéricas presentan cooperativismo.

El término cooperativismo se emplea en el caso de enzimas que posean varios sitios de unión a sustrato (se trata de enzimas oligoméricas). Estos sitios por acción de algún efector (un inhibidor, un activador o muchas veces el mismo sustrato) poseen distintas afinidades por el sustrato dependiendo de la concentración de efector presente. Este efecto requiere la presencia de varios sitios de unión a sustrato y se evidencia en las curvas de v vs $[S]$ como una curva sigmoidea.

Cuando un sustrato se une a una subunidad enzimática, el resto de las subunidades son estimuladas y se activan. Los ligandos pueden tener cooperatividad positiva, cooperatividad negativa o no cooperatividad.

A pesar de que la actividad reguladora de algunas enzimas obedecen la cinética de Michaelis-Menten, muchas de ellas son descritas mediante una cinética no hiperbólica, y/o por medio de isotermas de enlace. Tal comportamiento puede ser explicado en términos de la existencia de sitios múltiples para el enlace del sustrato a la enzima. Si el enlace de una molécula de sustrato al primer sitio facilita el enlace al segundo y así sucesivamente, el comportamiento cinético es sigmoideal. Este tipo de comportamiento se denomina cooperatividad positiva. Por otra parte, si el enlace de la molécula de sustrato al primer sitio inhibe el enlace al segundo y sitios subsecuentes, se dice que existe una cooperatividad negativa. En el caso de la cooperatividad positiva, existe una región en la isoterma de velocidad de reacción donde la conversión es mucho más sensible a la concentración de sustrato que en el caso de la isoterma hiperbólica. En el caso de la cooperatividad negativa existe una región de concentración en la que la velocidad de reacción es menos sensible a la concentración de sustrato que en el caso de la isoterma hiperbólica (figura 2.14). Estas interacciones que ocurren en sitios de enlace para ligandos idénticos se conocen como interacciones homotrópicas.

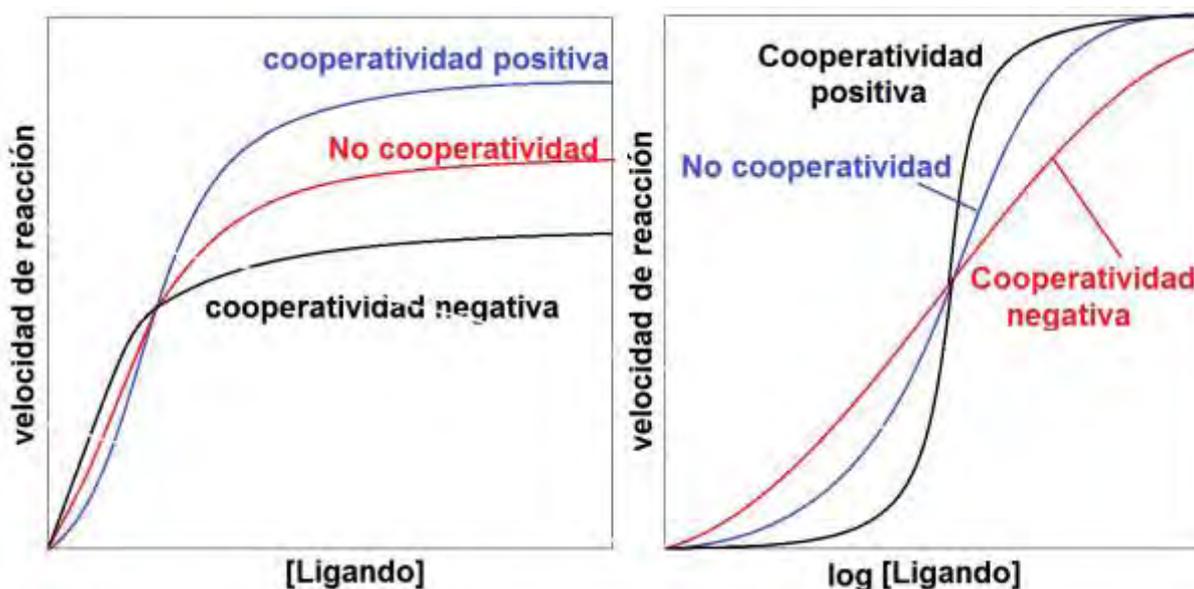


Figura 2.14 Gráficas de velocidad de reacción vs [ligando] para cooperatividad positiva, no cooperatividad y cooperatividad negativa.

Las interacciones heterotrópicas son aquellas que ocurren entre sitios de enlace de ligandos diferentes y son tipificadas por los efectos de los activadores e inhibidores sobre la actividad enzimática. Los efectos de los activadores o inhibidores pueden ser competitivos o no competitivos con respecto al enlace del sustrato. Los sistemas que exhiben comportamientos competitivos se denominan sistemas K, debido a que ellos involucran cambios en la constante aparente de Michaelis; mientras que los sistemas no competitivos se denominan sistemas V, ya que en su cinética solamente involucran cambios en la velocidad máxima.

En ambos sistemas, K y V, un efector puede actuar tanto como activador como inhibidor.

La mayoría de las enzimas alostéricas presentan curvas sigmoideas de saturación de sustrato. Por consiguiente el alosterismo ha llegado a ser sinónimo de respuesta sigmoidea. Sin embargo, no todas las cinéticas sigmoideas se explican mediante interacciones alostéricas. Y viceversa, no todas las enzimas alostéricas presentan cinéticas sigmoideas, tal es el caso de la inhibición no competitiva mencionada más arriba.

Existen modelos cinéticos para describir las interacciones alostéricas enzimáticas reportados en la literatura científica desde la década de los 70's; se trata de ecuaciones diferenciales ordinarias como las que hemos estado trabajando en este capítulo; uno de los artículos completos e importantes es el de Hammes y Wu, Kinetics of Allosteric Enzymes, publicado en 1974 en la revista Annual Review of Biophysics and Bioengineering. En este trabajo no se considera una descripción matemática de biorreactores con enzimas alostéricas para la ingeniería en alimentos, aunque se emplearían métodos de Euler o Runge-Kutta como los que se utilizaron en este capítulo.

Bibliografía

- [1] Herbert, Sauro (2011). Enzyme Kinetics for Systems Biology. Ambrosius Publishing.
- [2] Doran, Pauline.(2013) Bioprocess Engineering, 2nd edition. Academic Press. Elsevier
- [3] Villadsen, John; Nielsen, Jens; Lidén, Gunnar. (2013) Bioreaction Engineering Principles, Third Edition. Springer.
- [4] Botts, J.; Morales, M. (1953). Transactions of Faraday Society. 49: 696-707
- [5] Hammes, Gordon G. and Wu, Cheng Weng. (1974) Kinetics of Allosteric Enzymes. Annu. Rev. of Biophys and Bioeng. 3: 1-33.

Capítulo 3

CINÉTICA MICROBIANA

Resumen:

Una vez analizada la cinética enzimática y realizado el diseño de biorreactores batch catalizados con enzimas, ahora se lleva a cabo la implementación de los modelos del crecimiento de la población microbiana en el diseño de biorreactores microbianos para la ingeniería de alimentos. En este análisis se tienen que incluir aspectos estequiométricos, cinéticos y de dinámica de poblaciones. Los modelos cinéticos consideran situaciones de crecimiento poblacional de los microorganismos en estado estacionario y no estacionario. El modelo clásico fue propuesto en 1950 por Monod, galardonado posteriormente con el premio nobel por esta contribución. A dicho modelo se le pueden añadir términos adicionales correspondientes a la inhibición por parte del sustrato y por parte del producto, tal como se hizo en el caso de la cinética enzimática, obteniéndose algunos modelos estructurados y segregados que son los más modernos actualmente para la descripción de la dinámica microbiana.

3.1 Crecimiento celular

Dos aspectos fundamentales definen al crecimiento microbiano. Por un lado el estequiométrico, ya que la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y por la otra parte el de tipo cinético, el que dirá con que velocidad se lleva a cabo el proceso.

En el metabolismo celular, no todo el sustrato es consumido para la formación de nueva biomasa, si no que una parte se emplea para el mantenimiento celular, otra para la producción de producto y otra se dirige al desarrollo celular. Por esto, surge el concepto de rendimiento global estequiométrico teórico y el aparente. El rendimiento estequiométrico se define como la cantidad de biomasa o producto formado por la cantidad de sustrato consumido con esa finalidad, es decir corresponde la cantidad de biomasa o producto presente entre la cantidad total de sustrato consumido.

El crecimiento celular consta de cuatro fases [1, 2, 3], la primera se refiere a la fase de latencia, donde las células permanecen en acondicionamiento. La segunda fase es la de crecimiento exponencial; el medio rico en nutrientes propicia tal desarrollo hasta llegar a la tercera fase. Esta es la fase estacionaria, en ella el número de células nuevas que crecen es igual al número de células que perecen. La última fase, la de muerte, corresponde a un medio hostil donde se carece de alimento para el desarrollo de la biomasa y la población de los microorganismos decrece.

En la figura 3.1 se pueden apreciar tales fases:

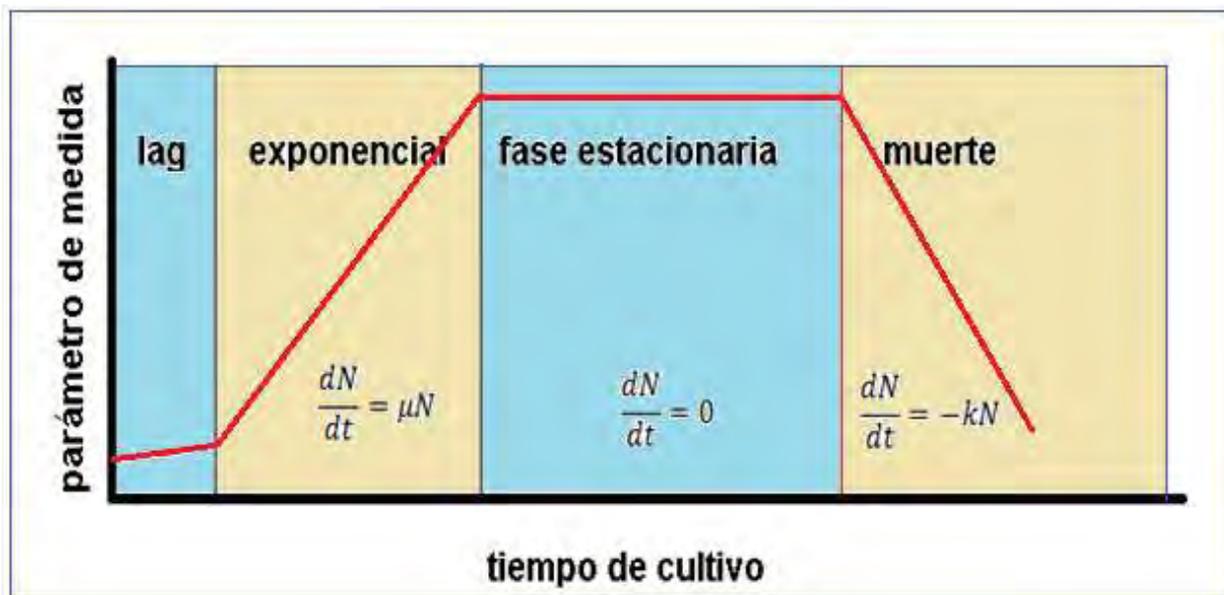


Figura 3.1 Etapas de crecimiento de la población microbiana.

Fuente: *Micribiología Clínica. Curso (2008).*
WWW.youtube.com/watch?v=_OoKEvyK_Vg

3.1.1 Fundamentos de balance de materia en reacciones de crecimiento microbiano.

Los modelos matemáticos para el crecimiento celular están basados en los principios de conservación de materia que se aplican a las reacciones que ocurren durante el metabolismo de los microorganismos y en las relaciones estequiométricas subyacentes [1, 2]. El siguiente esquema generalizado ejemplifica las reacciones que ocurren durante el crecimiento celular:

Fuente de C + Fuente de N₂ + O₂ + Minerales + Nutrientes específicos →

Masa celular + CO₂ + H₂O

Un caso en el que no intervienen ni minerales, ni nutrientes específicos, es el crecimiento aerobio de la *Saccharomyces cerevisiae*:

$C_6 H_{12} O_6 + aO_2 + b NH_3 + m.o. \rightarrow c CH_x O_y N_z + d CO_2 + e H_2O + \text{más m.o.}$

Donde m.o. significa microorganismos.

3.1.2 Composición elemental de algunos microorganismos

Los principales m.o. que se utilizan en biotecnología están compuestos por moléculas que contienen C,H,O,N,P,S. La siguiente tabla muestra la composición elemental de los m.o. más utilizados en la industria, así como el nutriente limitante que permite mantener el crecimiento de sus poblaciones [4].

Tabla 3.1 Ejemplos de microorganismos utilizados en la industria de alimentos

Microorganismo	Nutriente limitante	Formula empírica
Saccharomyces cerevisiae	Glucosa	CH _{1.7} N _{0.17} O _{0.46}
Cándida Utilis	Etanol	CH _{1.84} N _{0.20} O _{0.55}
Cándida Utilis	Glucosa	CH _{1.84} N _{0.20} O _{0.55}
Klebisella aerógenes	Glicerol	CH _{1.74} N _{0.22} O _{0.43}
Aerobácter aerógenes		CH _{1.78} N _{0.24} O _{0.33}

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:153528452

3.2 Cálculos estequiométricos

La determinación de los coeficientes estequiométricos para el crecimiento microbiano es fundamental para el diseño de procesos biotecnológicos. Enseguida se presenta, como ejemplo, los cálculos estequiométricos para el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* alimentada con glucosa:



Con base en la fórmula empírica de la *Saccharomyces* (CH_{1.7} N_{0.17} O_{0.46}), se puede plantear el siguiente balance átomo por átomo:

Balance de carbono: $6=c+d$

Balance de hidrogeno: $12 + 3b= 1.703c + 2e$

Balance de oxígeno: $6 +2a = 0.459 c + 2d+ e$

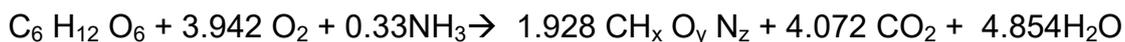
Balance de nitrógeno: $b=0.171c$

Dato adicional coeficiente respiratorio ($RQ = 1.033\text{mol CO}_2/\text{mol O}_2$)

La solución a este sistema de ecuaciones algebraicas simultáneas lineales da los siguientes valores para los coeficientes estequiométricos:

$a=3.942$; $b=0.33$; $c=1.928$; $e=4.854$.

Consecuentemente la reacción que representa el crecimiento microbiano de la *Saccharomyces* es:



3.3 Velocidad de crecimiento celular y rendimientos

El parámetro con el que se mide el crecimiento de la población celular puede especificarse en términos absolutos o como una variable intensiva. A la primera de ellas se le denomina velocidad de crecimiento celular (r_x), mientras que a la segunda se le conoce como velocidad específica de crecimiento (μ):

$$r_x = dx/dt ; \quad m = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad \text{--- (3.1)}$$

Uno de los parámetros más importantes de la cinética microbiana es el rendimiento. Dicho parámetro se puede especificar en referencia a:

- La cantidad de microorganismos producida por unidad de masa de sustrato, $Y_{x/s} = r_x / r_s$.
- La cantidad de producto producida por unidad de sustrato consumido, $Y_{p/s} = r_p / r_s$.
- La cantidad de dióxido de carbono por unidad de sustrato consumido, $Y_{c/s} = r_c / r_s$.
- La cantidad de microorganismos producida por unidad de oxígeno consumido, $Y_{x/o} = r_x / r_o$.

La siguiente tabla resume los diferentes tipos de rendimiento que se utilizan para la descripción matemática de la dinámica de la población microbiana.

Símbolo	Definición
Y _{x/s}	g de biomasa seca/g de sustrato consumido; Tasa de crecimiento molar: g de biomasa seca/mol de sustrato consumido.
Y _{x/o}	g de biomasa seca/g ó mol de oxígeno consumido
Y _{p/s}	g ó mol de producto/g ó mol de sustrato consumido
Y _{c/s}	mol de CO ₂ /mol de sustrato consumido

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:153528452

Los rendimientos bacterianos varían de acuerdo a las diferentes fuentes de carbono. La siguiente tabla muestra algunos datos del rendimiento bacteriano:

Símbolo	Y _{x/s} (g células/g sustrato)	Y _{x/o} (g células/g Oxígeno)	Y _Δ (g células/Kcal)
Malato	0.34	1.02	0.300
Acetato	0.36	0.70	0.210
Glucosa	0.51	1.47	0.420
Metanol	0.40	0.44	0.120
Etanol	0.68	0.61	0.180
Isopropanol	0.43	0.23	0.074
Parafinas	1.03	0.50	0.160

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:153528452

3.4 Rendimiento entálpico

Este parámetro termodinámico corresponde al calor generado por el metabolismo celular durante el consumo de sustrato [1,2]. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S}(1 + Y_{\Delta}\Delta H_C) = Y_{\Delta}\Delta H_S \text{ ---- (3.2)}$$

Donde:

- Y_{Δ} es el rendimiento entálpico
- (ΔH_S) es la entalpia de combustión del sustrato
- (ΔH_C) es la entalpia del material celular

$$Y_{\Delta} = \frac{Y_{X/S}}{(\Delta H_S - Y_{X/S}\Delta H_C)} \text{ ---- (3.3)}$$

El balance de calor para un crecimiento aeróbico se puede formular en los siguientes términos:

$$\Delta H_S \text{ (Calor generado por gramo de sustrato oxidado)} - Y_{X/S} \Delta H_C \text{ (Calor de combustión de las células producidas a partir del sustrato)} = \Delta H_G \text{ (Calor generador por gramo de sustrato consumido en la fermentación que produce células, CO}_2 \text{ y H}_2\text{O)}$$

3.5 Factores que afectan la interacción de las células con el medio ambiente.

La siguiente figura resume las interacciones físicas y químicas entre el medio ambiente de crecimiento y la población celular. Algunos de los factores especificados serán discutidos en mayor detalle en este capítulo.

Interacción célula-medio ambiente

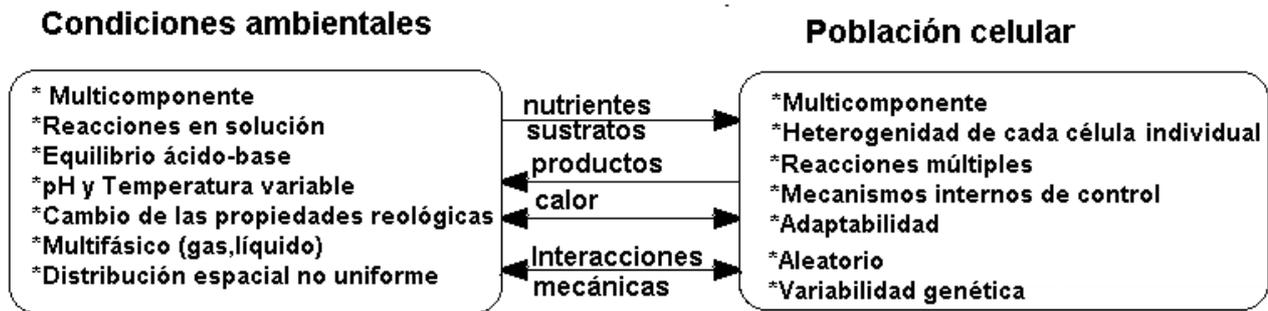


Figura 3.2 Interacción célula-medio ambiente

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:153528452

3.6 Descripción Cualitativa del crecimiento de la población celular

Si se pretende describir el comportamiento dinámico de la población celular, se deben considerar los siguientes factores:

- Cada célula individual es un sistema multicomponente, es decir, está compuesta por una gran variedad de organelos y sustancias químicas.
- El interior de cada célula es no homogéneo.
- El número de reacciones bioquímicas individuales que tienen lugar en cada célula es muy elevado.
- Los mecanismos de control interno de la célula son muy variados.
- Las células tienen capacidad de adaptarse a cambios en la composición del medio ambiente por diferentes mecanismos.
- Durante el crecimiento del cultivo celular pueden ocurrir mutaciones o algún tipo de presión selectiva que provoque cambios en las características genéticas de la población celular.
- En células modificadas genéticamente, puede producirse inestabilidad, perdiéndose la información genética introducida a lo largo del tiempo
- Cada célula individual evoluciona dentro de su ciclo de crecimiento, de manera que la población celular estará compuesta por células de diferentes, unas recién nacidas, otras en proceso de división y otras al final de su ciclo de vida.
- Durante las diferentes fases del ciclo celular las células varían en su actividad metabólica.
- En microorganismos no unicelulares la morfología y tamaño de los mismos varía sustancialmente a lo largo del crecimiento.

Es evidente que un modelo cinético de crecimiento poblacional que intente, contemplar todos los factores anteriores, es imposible de formular, y en todo caso su aplicación sería muy poco práctica debido a la gran cantidad de información

requerida. Por lo tanto la opción es introducir una serie de suposición para simplificar el problema pero que al mismo tiempo permitan obtener una representación útil de la cinética del crecimiento poblacional. En función del grado de aproximación se obtendrán modelos matemáticos más complejos o más simples.

Existen dos tipos de modelos, los estructurados y los segregados. En los modelos segregados se utilizan compartimientos múltiples, mientras que en los modelos estructurados el sistema se describe como un conjunto de células con características individuales distintas. Una tercera aproximación denominada crecimiento balanceado consiste en definir todo el proceso de crecimiento celular en términos de un componente individual el cual controla su velocidad, dado que es el sustrato limitante, mientras que los demás componentes se encuentran en concentraciones adecuadas que no limitan el crecimiento. Una cuarta aproximación, denominada célula promedio, consiste en considerar que todas las células de una población son iguales y se comportan de la misma manera. El caso real en el crecimiento de una población celular es el de un sistema estructurado y segregado pero es muy difícil de describir, y por lo tanto se utiliza poco. La aproximación más comúnmente empleada es la que permite la descripción más simple consistente en un sistema no segregado y no estructurado.

El siguiente esquema representa las características de las diferentes aproximaciones:

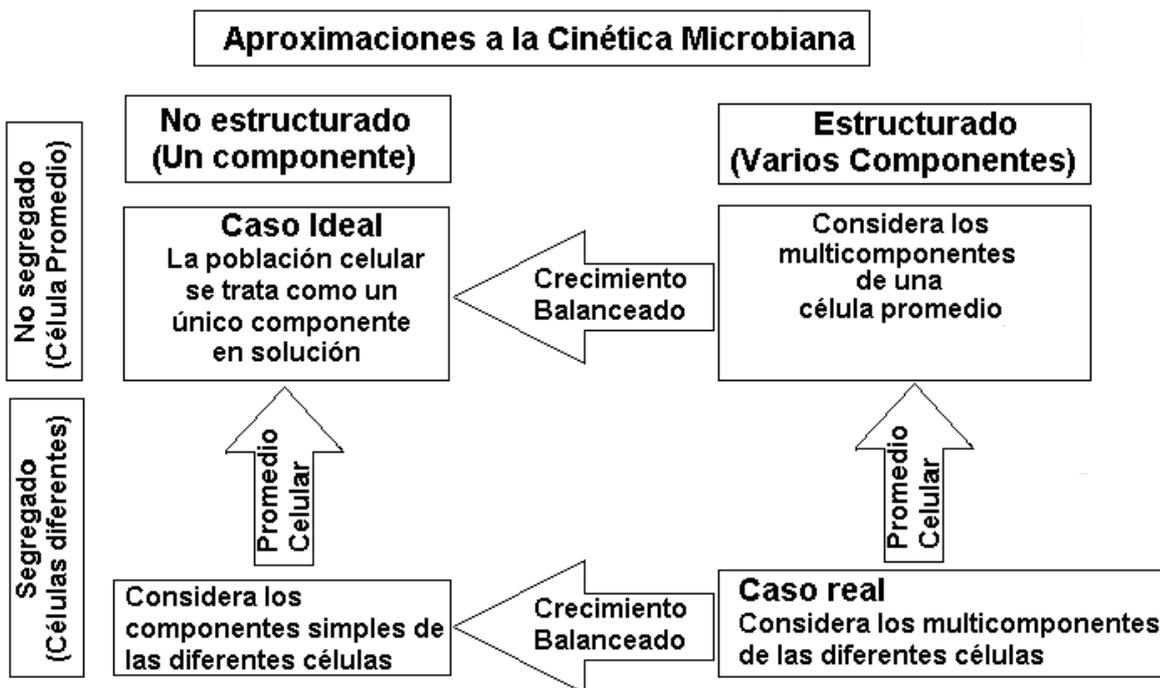


Figura 3.3 Aproximaciones a la Cinética Microbiana

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:1535284523.7
Fases del crecimiento celular discontinuo

El crecimiento de la población celular microbiana evoluciona por diferentes etapas, que son representadas en la figura 3.4.

El periodo de latencia es el tiempo que necesitan los microorganismos para adaptarse al nuevo medio y empezar a generar nuevas enzimas. Sus características se citan a continuación:

- El periodo de latencia depende de la edad de los microorganismos.
- Puede haber una edad óptima ya que los organismos más jóvenes normalmente se adaptan más rápidamente.
- El periodo de latencia puede reducirse realizando un crecimiento previo en un ambiente análogo.
- Se recomienda usar como siembra aproximadamente el 5% del fermentador.
- Puede haber varios periodos de inducción si se utilizan diferentes sustratos (crecimiento Diáuxico)

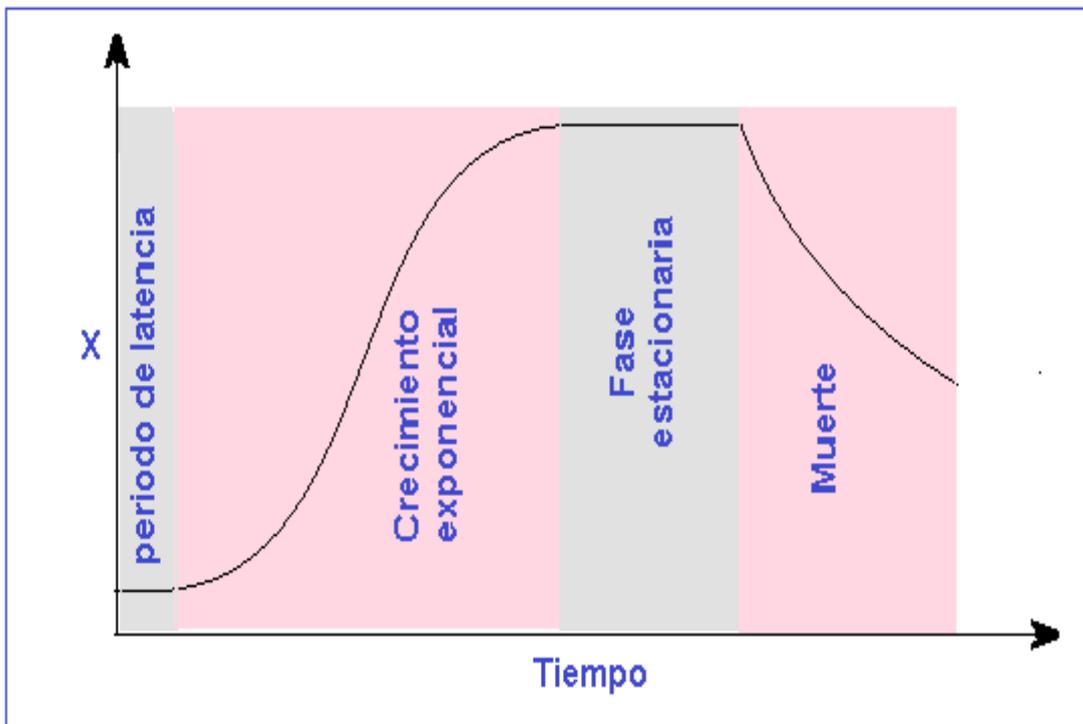


Figura 3.4 Etapas de crecimiento celular

3.7.1 Crecimiento exponencial

La fase de crecimiento exponencial, empieza con un crecimiento acelerado y termina con un breve periodo de crecimiento desacelerado, que se puede identificar en los extremos de la sigmoide.

Uno de los modelos matemáticos para describir la fase de crecimiento exponencial fue propuesto por Maltus. Considera una proporcionalidad lineal entre la rapidez de crecimiento y la magnitud de la población actual:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.4)$$

Donde μ es el coeficiente de proporcionalidad de la ley de Maltus. Al integrarse esta ecuación, considerando como condición inicial que la población de células es igual a X_0 en todo el tiempo hasta el final del periodo de latencia, se obtiene el siguiente resultado:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu(t - t_{lag}) \quad (3.5)$$

Consecuentemente la concentración de células en cualquier momento mayor a t_{lag} queda dada por:

$$X = X_0 \exp[\mu(t - t_{lag})] \quad (3.6)$$

Aprovechando las propiedades de la función logaritmo natural, se puede calcular el tiempo necesario para duplicar la población celular, el cual es:

$$t_{duplicación} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3.7)$$

Al graficar el logaritmo de la concentración celular contra el tiempo se obtiene una familia de rectas cuyas pendientes corresponden a diferentes valores de μ . Esto es de utilidad cuando se ajustan datos empíricos.

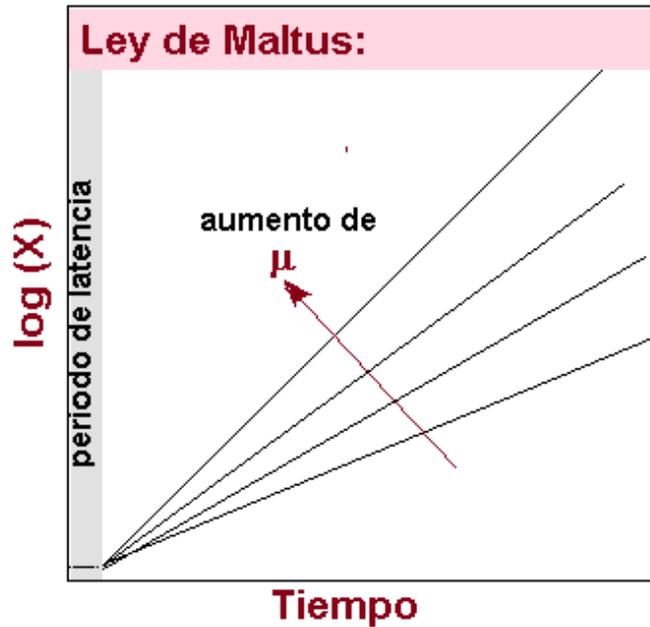


Figura 3.5 Diagrama de la Ley de Maltus

3.7.2 Fase estacionaria

Al término del crecimiento exponencial se alcanza una concentración máxima de la población celular debido a que se acaba el sustrato, modificando el pH e iniciando la formación de metabolitos tóxicos; luego la población celular llega a una etapa en la que no cambia su concentración y que dura un largo periodo de tiempo. La concentración máxima alcanzada depende de la concentración inicial de sustrato y es directamente proporcional a dicha concentración inicial, como puede verse en la siguiente figura:

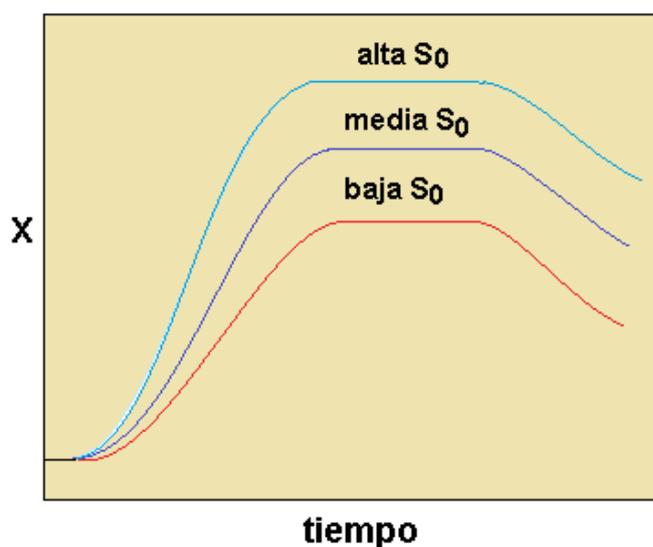


Figura 3.6 Gráfica de la etapa estacionaria en el crecimiento de la población microbiana a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

Para la fase de crecimiento se puede describir la rapidez de consumo de sustrato en términos de una relación proporcional con la cantidad de células que se tengan dentro de un reactor batch, de la siguiente manera:

$$-\frac{ds}{dt} = k_s x \quad (3.8)$$

Donde la concentración de microorganismos está dada por:

$$x = x_0 \exp(\mu t) \quad (3.9)$$

Sustituyendo esta expresión en la anterior ecuación diferencial se obtiene:

$$-\frac{ds}{dt} = k_s x_0 \exp(\mu t) \quad (3.10)$$

Cuya solución analítica es:

$$S = S_0 - \frac{K_s X_0}{\mu} [\exp(\mu t) - 1] \quad (3.11)$$

El siguiente algoritmo en Matlab permite graficar las concentraciones del sustrato y de las células conforme pasa el tiempo en la fase de crecimiento exponencial de la concentración de microorganismos:

```
function crecimientoexponencial
clear all;close all;clc;
ks=1e-1;%coeficiente cinético
mu=1e-1;% coeficiente de proporcionalidad de la ley de Maltus
nit=80;% número total de iteraciones
so=.1;%concentración inicial de sustrato
xo=.01;%concentración inicial de microorganismos
for i=1:nit
    t=.25*i;%cálculo de tiempo correspondiente a cada iteración
    x=xo*exp(mu*t);%población de microorganismos
    s=so-ks*xo/mu*(exp(mu*t)-1);%concentración de sustrato
    plot (t,x,'.');hold on;plot (t,s,'.r');%desplegado gráfico
    hold on;grid on;
end
```

Los resultados de la ejecución de este programa se muestran a continuación:

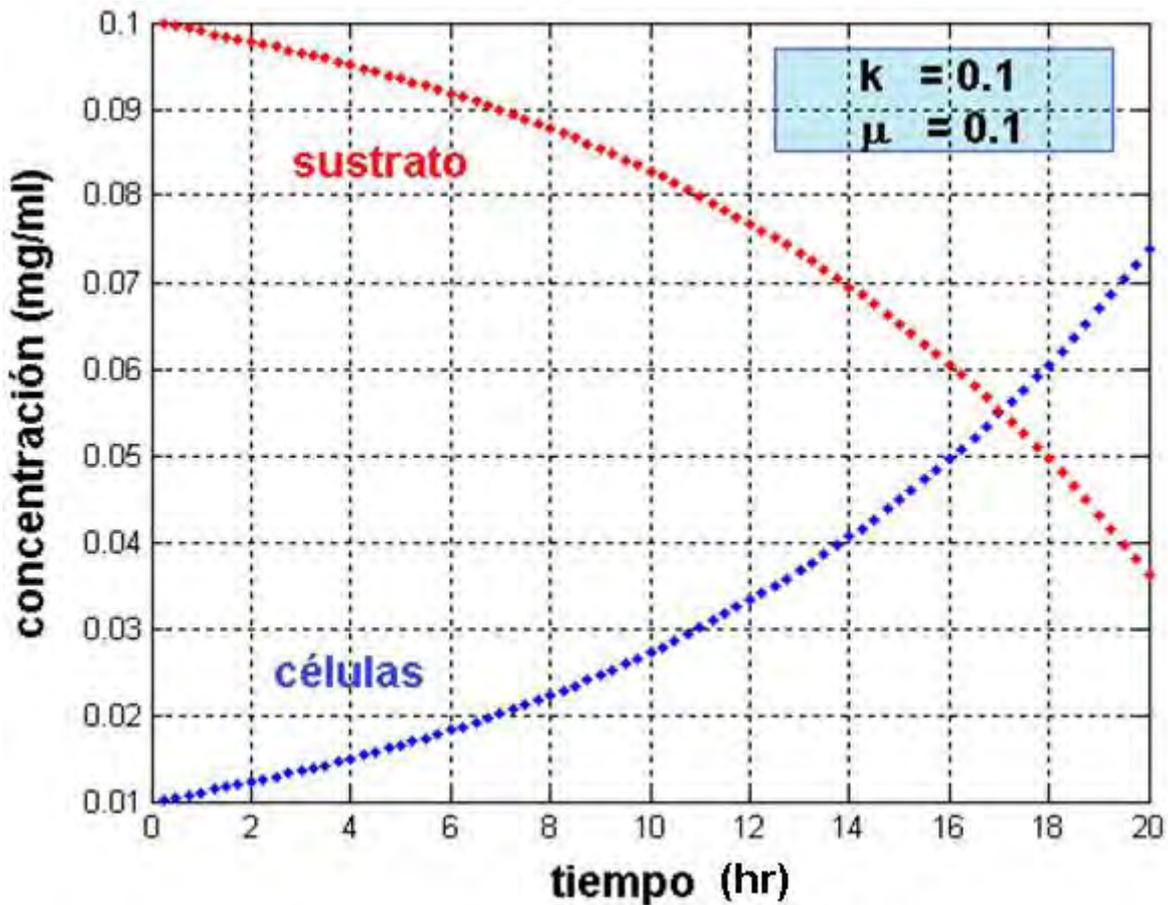


Figura 3.7 Rapidez de crecimiento exponencial microbiano por consumo de sustrato

Reacomodando la expresión de la concentración de sustrato, se obtiene:

$$s_0 - s = \frac{k_s}{\mu} (x - x_0) \text{ --- (3.12)}$$

Cuando se agota totalmente el sustrato, $s=0$, entonces la concentración de microorganismos alcanza un valor final, X_f , entonces se obtiene la ecuación de una línea recta:

$$X_f = X_0 + \frac{\mu}{k_s} S_0 \text{ (esta es la ecuación de la línea recta) --- (3.13)}$$

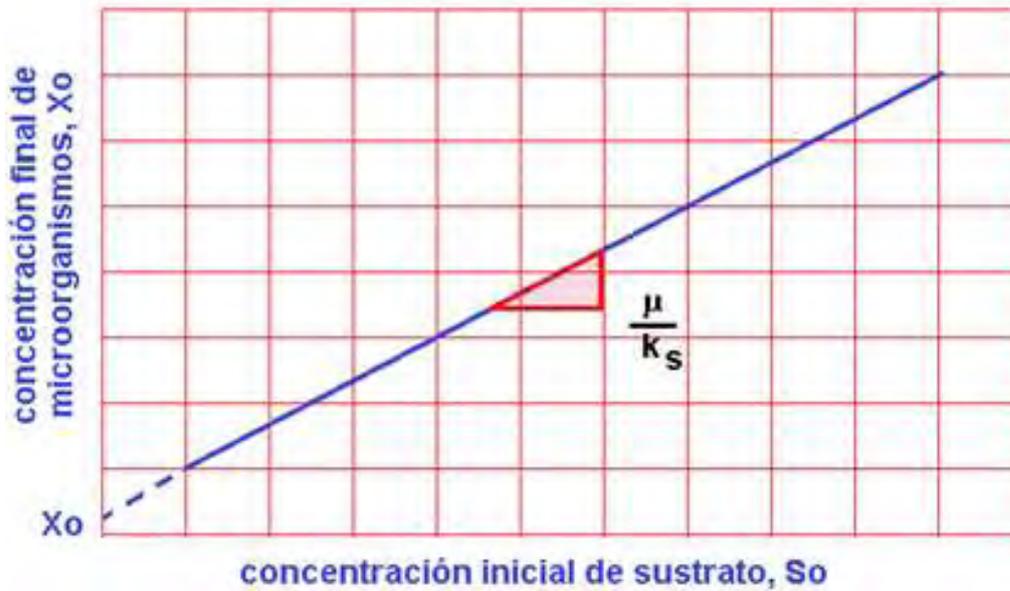


Figura 3.8 Dependencia de la población máxima de microorganismos con respecto a la concentración inicial de nutriente limitante.

Cuando se acumulan materiales tóxicos durante el crecimiento exponencial, la concentración de células máxima que se obtiene en el estado estacionario es independiente de la concentración inicial de sustrato, como puede observarse en la siguiente figura:

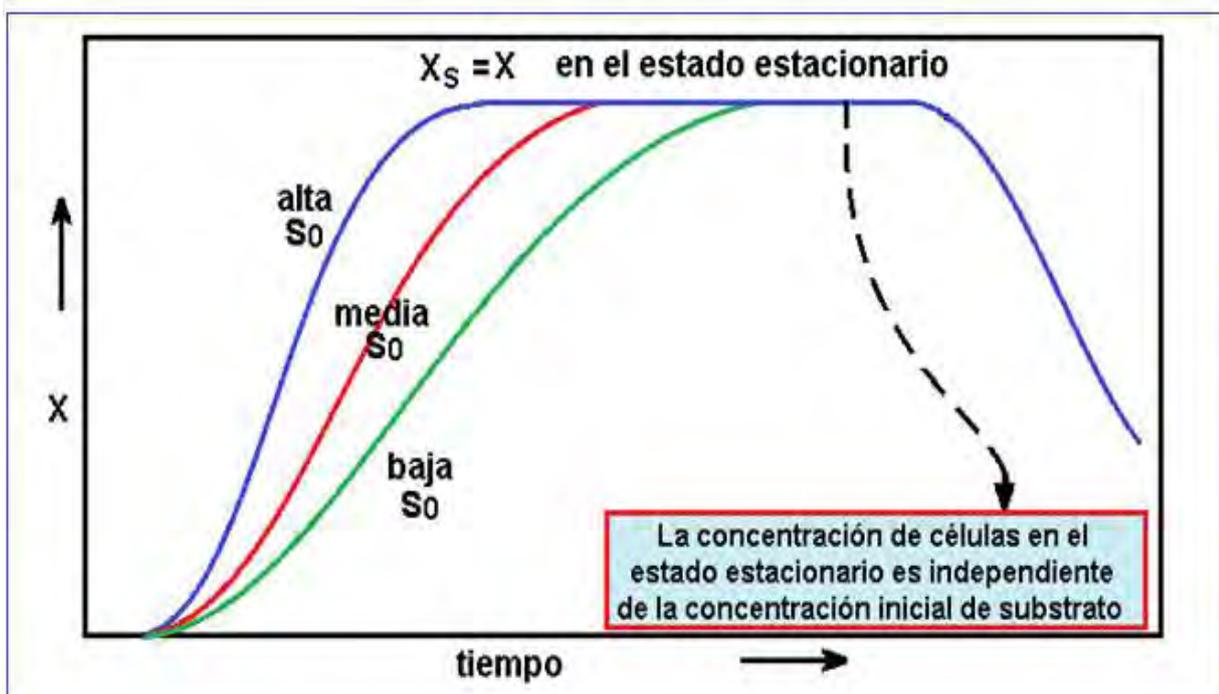


Figura 3.9 Fases de crecimiento exponencial y estado estacionario cuando se acumulan materiales tóxicos.

Con base en estas observaciones se puede graficar la concentración máxima de células, que se alcanza en el estado estacionario, como función de la concentración inicial de sustrato, lo cual se representa esquemáticamente a continuación:

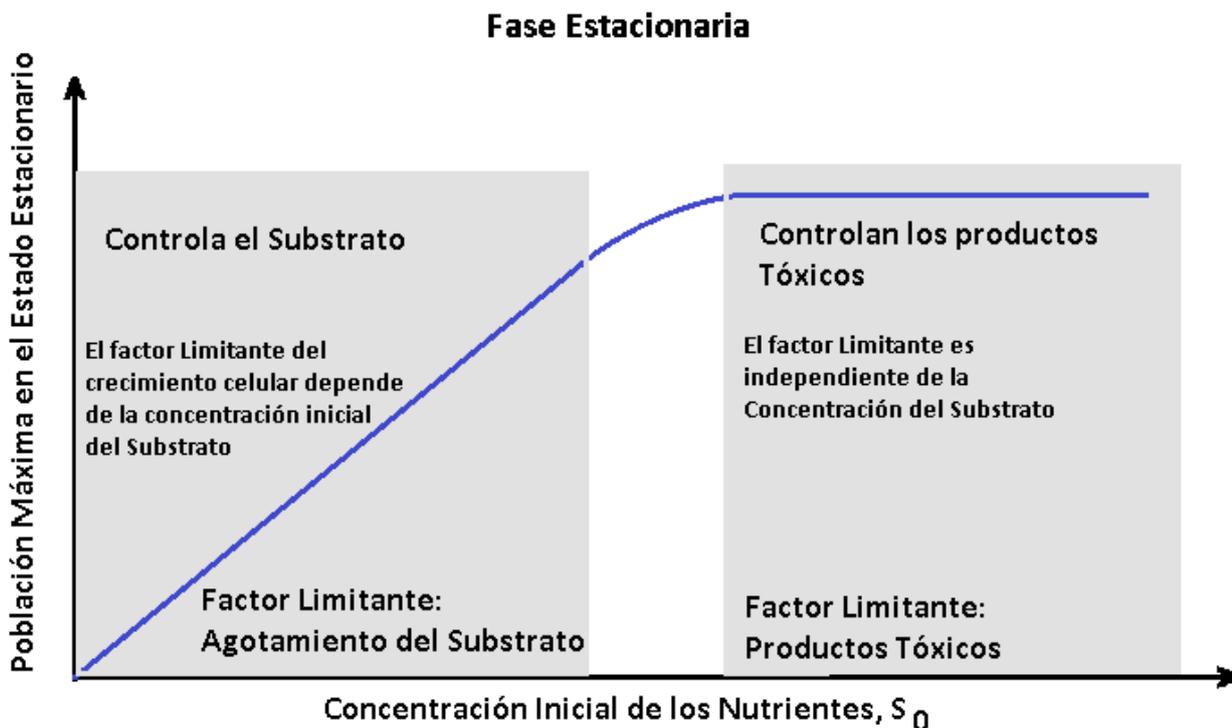


Figura 3.10 Gráfica de la fase estacionaria

3.7.3 Crecimiento diáuxico

La dinámica del crecimiento diáuxico se presenta cuando en el medio de reacción se encuentran varios sustratos. Las células no consumen varios sustratos simultáneamente sino que consumen primero al que pueden acabarse más rápidamente y luego el siguiente, y así, hasta agotar todos los sustratos. Aparentemente esto se debe a un mecanismo de selección natural, pues las células que consumen más rápidamente, tiene mayor posibilidad de reproducción, haciendo que predominen esas especies contra las que consumen sustratos que tardan más en comer. Como consecuencia, se pueden tener varios periodos de latencia con sus correspondientes estados estacionarios durante la dinámica del crecimiento poblacional. En la siguiente figura se esquematiza con el ejemplo del crecimiento diáuxico de la *Escherichia coli*, cuando se cultiva en un medio que contiene dos sustratos a la misma concentración inicial, Glucosa y Xilosa. La rapidez de consumo de la Glucosa es mayor que la de la Xilosa para la *E. coli*.

Crecimiento Diáuxico de la Escherichia Coli

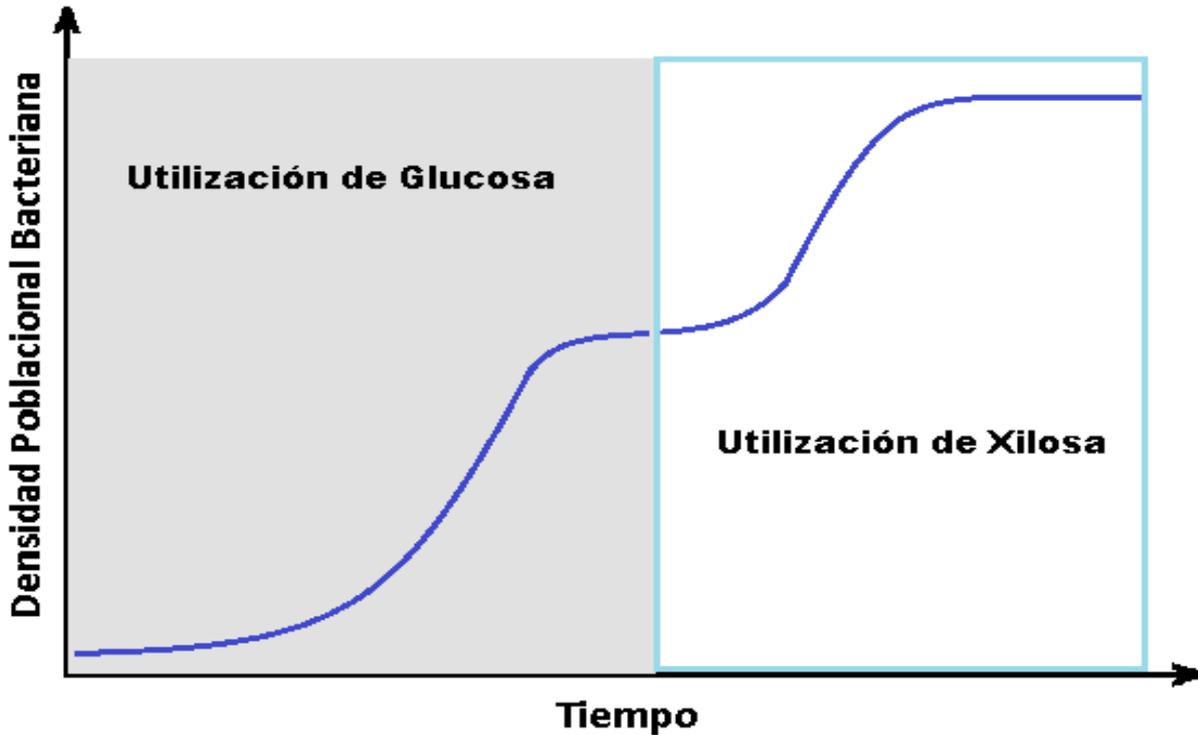


Figura 3.11 Crecimiento diáuxico de la Escherichia Coli

3.7.4 Muerte celular

Para la fase de muerte celular, se propone que la rapidez con que disminuye la población de microorganismos es directamente proporcional a la concentración actual de microorganismos.

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d * X_d \quad \text{--- (3.20)}$$

De donde X_d representa a la rapidez de muerte (death). Consecuentemente la concentración de microorganismos vivos varía de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\frac{dX_p}{dt} = \mu_m * X - K_d * X_d \quad \text{--- (3.21)}$$

La integración de la ecuación anterior da como resultado la población actual de microorganismos vivos, resultando un decrecimiento exponencial:

$$X_p = X_{v0} \exp(\mu_m - K_d) * t \quad \text{--- (3.22)}$$

La gráfica del periodo de muerte celular se presenta a continuación.

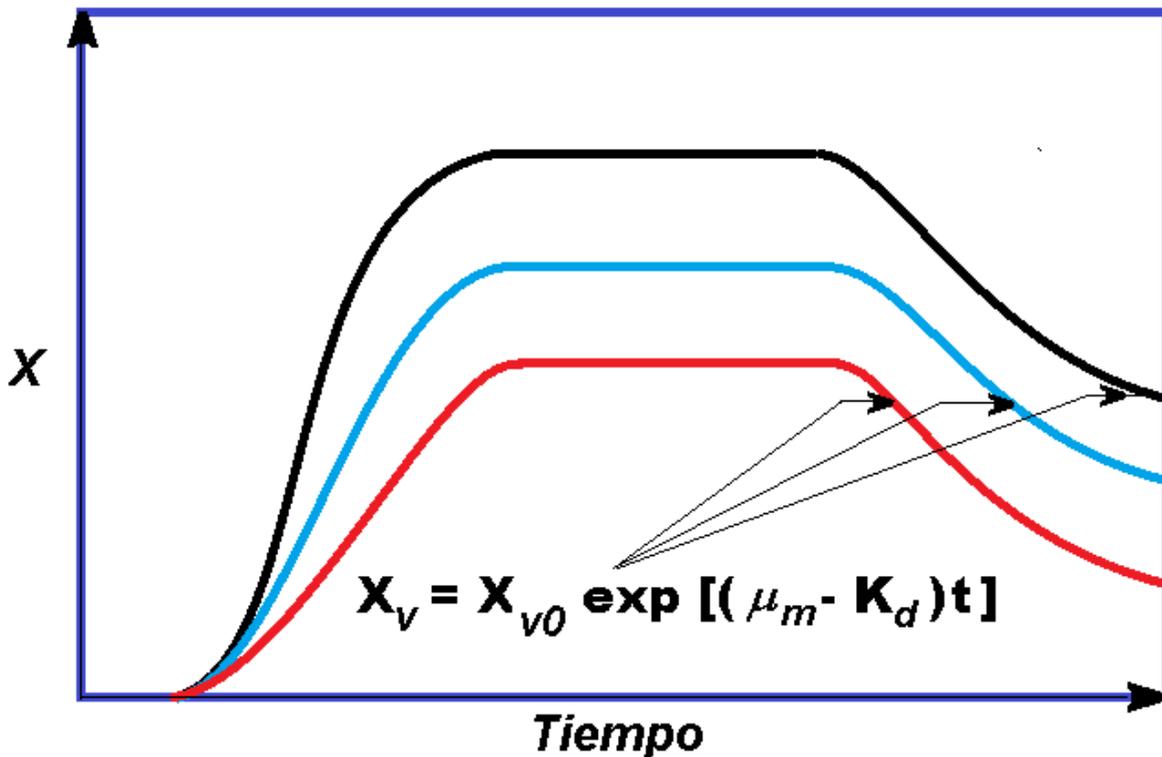


Figura 3.12 Gráfica del periodo de muerte celular

El siguiente programa permite simular las fases del periodo de latencia, crecimiento exponencial, estado estacionario y muerte de la población celular. Fue construido a partir de los modelos matemáticos que se acaban de explicar. Se hicieron acoplamientos de los diferentes modelos con la finalidad de darle continuidad al comportamiento global.

```

function Dinamicadefases1
% programa simulador de las fases de crecimiento exponencial,
% estacionaria y muerte, con los modelos de Verlhurst.
clear all; close all; clc;
tlag=140;%intervalo de tiempo de la etapa de latencia
tdeath=1200;%tiempo de inicio de la fase de muerte celular
nit=1500;%número de iteraciones en el tiempo
dt=01;%intervalo de tiempo para la simulación
mu=1.8e-2;%coeficiente de crecimiento de la población para la fase lag
xo=1e-3;%concentración inicial de microorganismos
xs=2e-2;%concentración inicial de sustrato
k=1e-2;%coeficiente cinético para el crecimiento exponencial
beta=(xs-xo)/xo;%diferencial adimensional entre concentraciones iniciales de sustrato y
microorganismos
mum=1e-2;% coeficiente de crecimiento de la población para la fase de muerte
Kd=1.1e-2;%coeficiente cinético para la etapa de muerte celular
xvo=0.02;% población de microorganismos en la fase estacionaria
for t=1:nit

```

```

time=dt*t;%especificación del tiempo
y1=xo*exp(mu*(time-tlag));%evolución concentración substrato durante fase lag
y2=xs/(1+beta*exp(-k*time));%evolucn concent subst durante crecimiento exponencial
if (t<260)
    y=y1;%si el tiempo es menor que 260, la concentración de substrato es igual a y1
else
    y=y2;%si el tiempo es mayor que 260, concentración substrato es igual a y2
end
if (t>tdeath)
    %evolución de la concentraciónn del substrato durante el periodo de muerte
    y=xvo*exp((mum-Kd)*(time-tdeath));
else
end
plot (time,y1,'.'); hold on;
plot (time,y2,'.r'); hold on;
plot (time,y,'.r'); hold on;
end
grid on;

```

Los resultados de la ejecución de este programa se presentan a continuación.



Figura 3.13 Gráfica de simulación computacional de las etapas de crecimiento microbiano.

En esta figura pueden observarse las etapas de crecimiento exponencial, estado estacionario y de muerte celular, utilizando el modelo de Verlhurst de 1844.

3.7.5 Modelos matemáticos para las fases de crecimiento exponencial y el estado estacionario

Con base en sus resultados experimentales, en 1844 Verlhurst propuso un modelo en el que expresaba que la rapidez de crecimiento de la población celular es proporcional a la concentración actual de microorganismos, multiplicada por la diferencia entre la concentración máxima de toxinas alcanzable en estado estacionario y la concentración actual de dichas toxinas. Y a su vez, que la rapidez de aumento de la concentración de toxinas es linealmente proporcional a la rapidez de crecimiento de la población microbiana. Expresando estas ideas en términos de ecuaciones diferenciales, se obtiene:

$$\frac{dX}{dt} = k' X (C_{Tmax} - C_T) \quad (3.14)$$

$$\frac{dC_T}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} \quad (3.15)$$

Al integrar esta última ecuación, se puede evaluar la concentración actual de toxinas en función de la diferencia entre la concentración actual de microorganismos y su concentración inicial:

$$C_T = \alpha(X - X_0) \quad (3.16)$$

Consecuentemente la concentración máxima de toxinas es:

$$C_{Tmax} = \alpha(X_S - X_0) \quad (3.17)$$

Por lo tanto la ecuación diferencial de primer orden de variables separables que representa la rapidez del crecimiento poblacional microbiano es:

$$\frac{dX}{dt} = k' \alpha X (X_0 - X) = k X (X_0 - X) \quad (3.18)$$

Llevando a cabo la integración de la ecuación anterior por fracciones parciales, se obtiene la ecuación de la evolución de microorganismos dentro de reactor batch:

$$X = \frac{X_S}{1 + \left(\frac{X_S - X_0}{X_0}\right) e^{-Kt}} \quad (3.19)$$

3.8 Modelo de Monod

3.8.1 Datos biográficos de Jacques Monod

Jacques Lucien Monod biólogo francés nacido en París el 9 de Febrero de 1910, en una familia de hugonotes. Obtuvo su licenciatura en ciencias en 1931. Después de ingresar a la Facultad de Ciencias de París en 1934 y de una estancia breve en el Caltech en 1936, Monod ingresó al Instituto Pasteur, obteniendo su doctorado en Ciencias Naturales en 1941. Fue nombrado director del departamento de Bioquímica Celular en 1954, y en 1959 fue contratado como Profesor de Química del Metabolismo en la Sorbonne de París. En 1967 fue distinguido como Professor en el colegio de Francia y en 1971 como director del Instituto Pasteur. Por su participación en la segunda guerra mundial fue condecorado con la cruz de guerra y la estrella de bronce, fue coronel honorario de la reserva y caballero de la legión de honor. En 1958 inició su colaboración con Francois Jacob consiguiendo demostrar que la inducción enzimática puede explicarse en términos puramente bioquímicos. A continuación, además de introducir el concepto del "ADN mensajero", identificaron grupos de genes organizados en estructuras que dirigen los procesos metabólicos y que son activados o inhibidos por otros genes que se encuentran en sus estructuras. Tales estudios dieron un fuerte impulso a la genética molecular y por ellos les fue otorgado el Premio Nobel en 1965, compartido con el microbiólogo André Michel Lwoff.

3.8.2 Desarrollo del modelo de Monod

El modelo matemático para el crecimiento de la población celular es el modelo empírico formulado por Monod a mediados del siglo XX. Matemáticamente es muy similar al modelo mecanístico de Michaelis-Menten para reacciones catalizadas por enzimas. La ecuación de Monod, $\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_S + C_S}$, describe suficientemente bien la etapa de crecimiento exponencial y la fase desacelerante de la concentración celular, durante procesos batch de crecimiento poblacional. El balance infinitesimal de materia sobre la población microbiana conduce al siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales para la evolución de las concentraciones de los microorganismos (x) y del sustrato (S):

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x = \frac{\mu_{max} C_S}{K_S + C_S} C_x \text{ --- (3.23)}$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S}} \frac{\mu_{max} C_S}{K_S + C_S} C_x \text{ --- (3.24)}$$

Siendo $Y_{x/S}$ el coeficiente de rendimiento estequiométrico de gramos de biomasa producido por cada gramo de sustrato.

Cuando se desea obtener μ_{max} y k_s a partir de datos empíricos, se linealiza la ecuación diferencial de la siguiente manera:

$$Si \quad \frac{dx}{dt} = r_x \quad \text{--- (3.25)}$$

$$r_x = \mu_{max} \frac{Sx}{k_s + S} \quad \text{--- (3.26)}$$

$$\frac{1}{r_x} = \frac{K_S + S}{\mu_{max} Sx} \quad \text{--- (3.27)}$$

$$\frac{1}{r_x} = \frac{K_S}{\mu_{max} Sx} + \frac{1}{\mu_{max} x} \quad \text{--- (3.28)}$$

Multiplicando por Sx :

$$\frac{Sx}{r_x} = \frac{k_s}{\mu_{max}} + \frac{1}{\mu_{max}} S \quad \text{--- (3.29)}$$

La linealización anterior se hace cuando se desea averiguar el crecimiento celular para el caso que la velocidad específica de crecimiento sea constante.

Para el caso de que la velocidad de crecimiento se halle en un sistema (reactor) Batch y dependa a su vez de la concentración del sustrato, se tiene que introducir el concepto de rendimiento de la reacción, que se define como:

$$Y = -\frac{\Delta x}{\Delta S} \quad \text{--- (3.30)}$$

En términos de diferencial:

$$Y = -\frac{dx}{dS} \quad \text{--- (3.31)}$$

Integrando la ecuación diferencial de x_0 a x y de S_0 a S

$$\int_{x_0}^x dx = -Y \int_{S_0}^S dS \text{ --- (3.32)}$$

Tenemos la siguiente ecuación

$$x - x_0 = Y(S_0 - S) \text{ --- (3.33)}$$

Despejando a S:

$$S = S_0 + \frac{x_0 - x}{Y} \text{ --- (3.34)}$$

Y sustituyendo en la ecuación diferencial

$$\frac{dx}{dt} = \left(\mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \right) x \text{ --- (3.35)}$$

Queda de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} x}{S_0 + \frac{x_0 - x}{Y} + K_S} \left(S_0 + \frac{x_0 - x}{Y} \right) \text{ --- (3.36)}$$

Arreglando términos

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} x (YS_0 + x_0 - x)}{YS_0 + YK_S + x_0 - x} \text{ --- (3.37)}$$

Resolviendo la ecuación diferencial por el método de variables separables

$$\mu_{max} \int_0^t dt = \int_{x_0}^{x_1} \frac{dx}{x} \left(\frac{YS_0 + YK_S + x_0 - x}{YS_0 + x_0 - x} \right) \text{ --- (3.38)}$$

Resolviendo por fracciones parciales la integral se ve como:

$$\mu_{max} \int_0^t dt = \int_{x_0}^{x_1} \left(\left(\frac{YS_0 + YK_S + x_0}{YS_0 + x_0} \right) * \frac{1}{x} + \frac{YK_S}{(YS_0 + x_0)(YS_0 + x_0 - x)} \right) dx \quad (3.39)$$

Integrando queda como:

$$\frac{YS_0 + YK_S + x_0}{YS_0 + x_0} \ln \left(\frac{x_1}{x_0} \right) + \frac{Yk_s}{YS_0 + x_0} \ln \left(\frac{YS_0}{YS_0 + x_0 - x_1} \right) = \mu_{max} t \quad (3.40)$$

La ecuación anterior es la variante de la ecuación de Monod para sistemas que dependen directamente de la concentración del sustrato ya que de él depende si el crecimiento celular es eficiente o provocará la muerte celular; asimismo, es una consideración en el diseño de reactores biológicos

3.8.3 Modificaciones al modelo de Monod

Cuando el modelo de Monod no puede simular con precisión las fases de crecimiento iniciales, se puede intentar con una leve modificación a dicho modelo. Esa modificación suele involucrar a una enzima, cuya baja disponibilidad limitaría la rapidez del crecimiento, al no estar presente suficiente cantidad de inóculo o cultivo inicial. A pesar de que el crecimiento de la población celular es un proceso complejo mediado por miles de enzimas, puede ser suficiente hipotetizar que una sola enzima podría ser la entidad biológica que limitaría la rapidez de crecimiento, por lo menos durante la fase lag. Incorporando tal efecto, la ecuación modificada de Monod puede escribirse de una forma aún más parecida al modelo de Michaelis-Menten:

$$\mu = \frac{\mu_{max} E_R C_S}{K_S + C_S} \quad (3.41)$$

Donde E_R representa la concentración relativa de la enzima clave.

El contenido relativo de la enzima clave en el interior de las células, E_R , puede ser escrito como $E_R = e/e_{max}$, donde e es la concentración intracelular de la enzima clave (g de enzima/g de biomasa) y e_{max} es el valor máximo de dicha concentración obtenido durante la fase de crecimiento exponencial. El balance infinitesimal para la concentración intracelular de enzima puede escribirse en términos de eC_x , en unidades de g de enzima/g de cultivo, quedando:

$$\frac{d}{dt}(eC_x) = \frac{\alpha C_S C_x}{K_S + C_S} - \beta eC_x \quad (3.42)$$

Donde α y β son los coeficientes de rapidez de síntesis y degradación enzimática, respectivamente. Realizando la derivada del producto y dividiendo entre C_x , se obtiene la ecuación para la evolución de la concentración de e:

$$\frac{d}{dt}e = \frac{\alpha C_S}{K_S + C_S} - \beta e - \frac{1}{C_x}e \frac{d}{dt}C_x \quad \text{--- (3.43)}$$

El último término de esta ecuación corresponde a la dilución debida al crecimiento celular, el cual podría ser obtenido de manera similar para todas las especies intracelulares. Esta ecuación puede ser resuelta y graficada para producir la parte inferior de la gráfica de la dinámica de crecimiento batch. El nivel máximo de enzima intracelular e_{max} puede ser calculado fácilmente igualando a cero la ecuación anterior y resolviendo para condiciones de estado estacionario:

Como $\frac{d}{dt}C_x = \mu C_x$, la ecuación de balance infinitesimal para la especie e puede escribirse como:

$$\frac{d}{dt}e = \frac{\alpha C_S}{K_S + C_S} - (\beta + \mu)e = 0 \quad \text{--- (3.44)}$$

Despejando:

$$e = \frac{\alpha C_S}{(K_S + C_S)(\beta + \mu)} \quad \text{--- (3.45)}$$

Para C_S , mucho mayor que K_S se obtiene:

$$e = \frac{\alpha}{\beta + \mu} \quad \text{--- (3.46)}$$

En términos de los parámetros del modelo, el nivel máximo de enzima intracelular que se obtiene durante la fase de crecimiento celular, cuando $C_S \gg K_S$, es:

$$e_{max} = \frac{\alpha}{\mu_{max} + \beta} \quad \text{--- (3.47)}$$

Empezando con un bajo contenido de la enzima clave, es decir, iniciando con una cantidad baja de cultivo o inóculo, la presencia del sustrato induce la síntesis de la enzima clave. Dicho bajo contenido de e provoca un retardo en la manifestación de la etapa inicial de crecimiento (periodo de latencia). La concentración de la enzima clave alcanza y permanece en su valor máximo durante la etapa de crecimiento exponencial, la cual muestra un incremento lineal en la gráfica semilogarítmica de la concentración celular. La pendiente de esta línea es la máxima rapidez de crecimiento, μ_{max} . Conforme se agota el sustrato, la rapidez de crecimiento de la pendiente de esta curva disminuye y se hace cero cuando el sustrato se ha consumido por completo. Cuando ya no hay sustrato, la síntesis de la enzima clave se detiene iniciándose procesos de degradación enzimática durante las fases

estacionaria y de muerte celular, lo cual hace disminuir el contenido enzimático intracelular hasta niveles muy bajos.

3.9 Modelo matemático para el crecimiento diáuxico

Considérese el crecimiento celular promedio en un reactor batch que contiene dos diferentes sustratos carbonados, S_1 y S_2 , los cuales son capaces de favorecer el crecimiento de la población celular. Para el crecimiento por consumo de cada sustrato, las reacciones son:

Células + sustrato 1 \rightarrow más células + producto

Células más sustrato 2 \rightarrow más células + producto

Con expresiones de velocidad de crecimiento tipo Monod modificadas:

$$\mu_1 = \frac{\mu_{\max 1} E_1 C_{S1}}{K_1 + C_{S1}} \text{ --- (3.48)}$$

$$\mu_2 = \frac{\mu_{\max 2} E_2 C_{S2}}{K_2 + C_{S2}} \text{ --- (3.49)}$$

Cuando ambos sustratos están presentes en un reactor batch, las células no consumen ambos sustratos simultáneamente sino que en lugar de ello, los consumen secuencialmente. Es decir, la rapidez de crecimiento máximo específica para sustratos mezclados es:

$$\mu_{\text{mezclado}} \neq \mu_{\max 1} + \mu_{\max 2} \quad \text{sino} \quad \mu = \text{cualquiera} \quad \mu_{\max 1} \text{ o } \mu_{\max 2}$$

El crecimiento secuencial da como resultado un esquema interesante de células consumiendo primero un sustrato preferido y después de una fase de latencia, consumiendo el segundo sustrato, menos preferido. Es decir, el sustrato menos preferido no es utilizado sino hasta que el sustrato preferido ha sido completamente consumido. Este consumo secuencial fue observado en numerosos experimentos por Monod, quien le dio el nombre de crecimiento diáuxico (de las raíces griegas para “dos fases”)

Una característica consistente en el crecimiento diáuxico es que el sustrato preferido favorece un crecimiento más rápido, es decir, $\mu_{\max 1} > \mu_{\max 2}$. Este crecimiento secuencial es observado experimentalmente en la mayoría de los cultivos batch con múltiples sustratos. Kompala hipotetizó en 1986 que la preferencia por la velocidad

de crecimiento más rápida en la primera etapa se debe a presiones evolutivas de los microorganismos a crecer lo más rápido posible. Si las células creciesen simultáneamente consumiendo ambos substratos, su rapidez de crecimiento sería reducida al promedio de las dos velocidades, no a la suma de ambas.

El fenómeno de crecimiento diáuxico ha sido modelado con ecuaciones modificadas de Monod, maximizando la rapidez de crecimiento instantánea a través de variables “cibernéticas” hipotéticas. Dichas variables, u_i y v_i representan el resultado de los procesos reguladores intracelulares que controlan la síntesis y actividad enzimática, respectivamente; siendo determinadas por medio de la maximización de la rapidez de crecimiento instantánea.

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_1 v_1 + \mu_2 v_2) C_X \text{ --- (3.50)}$$

$$\frac{dC_{S1}}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S1}} \mu_1 v_1 C_X \text{ --- (3.51)}$$

$$\frac{dC_{S2}}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S2}} \mu_2 v_2 C_X \text{ --- (3.52)}$$

$$\frac{de_i}{dt} = \frac{\alpha_i C_{Si}}{K_i + C_{Si}} u_i - \beta_i e_i - \frac{1}{C_X} \frac{dC_X}{dt} e_i \quad i = 1, 2 \text{ --- (3.53)}$$

$$\text{con } u_i = \frac{\mu_i}{\sum_j \mu_j} y v_i = \frac{\mu_i}{\max_j \mu_j} \text{ para } i = 1, 2, \quad j = 1, 2 \text{ --- (3.54)}$$

El último término en la ecuación (7.3.13) es la dilución típica de una especie intracelular debido al crecimiento de la población celular. Durante el crecimiento exponencial debido al consumo de un solo substrato, el nivel máximo de la concentración de la enzima clave corresponde a:

$$e_{max,i} = \frac{\alpha_i}{\mu_{max,i} + \beta_i} \text{ --- (3.55)}$$

Para este modelo que utiliza variables cibernéticas, los parámetros son los del modelo de Monod para crecimiento con cada uno de los sustratos por separado, a los cuales se suman los parámetros α_i y β_i para la síntesis y degradación de las enzimas clave. Como las enzimas clave que limitan la velocidad son hipotéticas, a pesar de que en algunas ocasiones pueden ser identificadas como en el caso de la β -galactosidasa para la producción de lactosa, a los parámetros adicionales del modelo (α_i y β_i) comúnmente se les asigna valores estimados por suposiciones, en lugar de ser deducidos a partir de datos experimentales.

Las variables cibernéticas representan la respuesta óptima de la síntesis y actividad enzimática que permite maximizar el crecimiento instantáneo de las células, para cualquier composición dada.

Por ejemplo, si el sustrato 1 está presente a una menor concentración que el sustrato 2 al principio del crecimiento en un reactor batch, pero la rapidez de crecimiento instantánea μ_1 es mayor que μ_2 , la mayor parte de las enzimas necesarias para el consumo del sustrato 1 serán sintetizadas ($u_1 > u_2$) y estarán activas ($v_1 > v_2$). Esto se ilustra con la siguiente simulación numérica, usando las concentraciones de 4g/l para el sustrato(1), y 20g/l sustrato(2). Sin embargo debido a que los valores de los parámetros del modelo utilizados ($\mu_{max,1} = 0.9 \text{ hr}^{-1}$, ($\mu_{max,2} = 0.6, \text{ hr}^{-1}$, $K_1 = 0.1 \text{ g/L}$, $K_2 = 0.5 \text{ g/L}$, $\alpha_i = 0.0001 \text{ hr}^{-1}$, $\beta_i = 0.05 \text{ hr}^{-1}$) y las condiciones iniciales para las dos enzimas clave ($e_{1,0} = 8.3 \times 10^{-5}$, cercano a su valor máximo; $e_{2,0} = 1 \times 10^{-6}$, cercano a su valor más bajo), la rapidez de crecimiento del sustrato 1 permanece más alta que la del sustrato 2 hasta que el sustrato 1 sea completamente consumido.

Consecuentemente las variables cibernéticas u_1 y v_1 para la síntesis de la primera enzima y sus actividad, permanecen muy cercanas a su valor máximo durante la primera fase de crecimiento.

3.9.1 Algoritmo computacional para el crecimiento diáuxico

El siguiente programa, formulado a partir del modelo con variables cibernéticas, permite visualizar los efectos del crecimiento diáuxico:

```
function diauxicoevita
clear all;close all;clc;
mumax1=0.009;%coeficiente de crecimiento máximo para consumo del 1er sustrato
mumax2=0.006;%coeficiente de crecimiento máximo para consumo del 2o sustrato
k1=0.1;%constante tipo Michaelis para consumo de primer sustrato
k2=0.5;%constante tipo Michaelis para consumo de segundo sustrato
yxs1=2.44498e-2;%coeficiente estequiométrico para primer sustrato
yxs2=.021;%coeficiente estequiométrico para segundo sustrato
alfa1=1e-1;%coeficiente para crecimiento de primera enzima clave
alfa2=2e-1;%coeficiente para crecimiento de segunda enzima clave
```

```

beta1=0.05;%coeficiente para crecimiento de primera enzima clave
beta2=0.5;%coeficiente para crecimiento de segunda enzima clave
E10=5e-5;%concentración inicial primer enzima clave
E20=1e-5;%concentración inicial segunda enzima clave
X0=1;%concentración inicial de microorganismos
S10=20;%concentración inicial de primer sustrato
S20=40;%concentración inicial de segundo sustrato
S1=S10; S2=S20;E1=E10;E2=E20;X=X0; %condiciones iniciales
dt=1e-4; nit=1000000;%paso de tiempo y número total de intervalos de tiempo
for t=1:nit
    mu1=mumax1/E1*S1/(k1+S1);%Coef de crecmnto por consumo de 1er sustrato
    mu2=mumax2/E2*S2/(k2+S2);%Coef de crecmnto por consumo de 2o sustrato
    mumax=mu1;%asignación de mu1 a rapidez de crecimiento máximo
    if (mu2>mumax)
        mumax=mu2;%si mu2 es mayor que mumax, mumax se hace igual a mu2
        v2=mu2/mumax;%cálculo de v2
        v1=0;%v1=0 indica que no se consume el primer sustrato
    else
        mumax=mu1;%si mu1 es mayor que mumax, mumax es igual a mu1
        v1=mu1/mumax;%cálculo de v1
        v2=0;%v2=0 indica que no se consume el segundo sustrato
    end
    u1=mu1/(mu1+mu2);%variable cibernética u1
    u2=mu2/(mu1+mu2);%variable cibernética u2
    dXdt=(mu1*v1+mu2*v2)*X;%Rapidez de crecimiento de población microbiana
    X=X+dt*(mu1*v1+mu2*v2)*X;%cálculo de la concentración de microorganismos
    S1=S1-dt/yxs1*mu1*v1*X;%cálculo de la concentración de sustrato 1
    S2=S2-dt/yxs2*mu2*v2*X;%cálculo de la concentración de sustrato 2
    %cálculo de la concentración de enzima clave 1
    E1=E1+dt*(alfa1*S1*u1/(k1+S1)-beta1*E1-1/X*E1*dXdt);
    %cálculo de la concentración de enzima clave 2
    E2=E2+dt*(alfa2*S2*u2/(k2+S2)-beta2*E2-1/X*E2*dXdt);
    contar =t/4000;
    if (contar-ceil(contar))==0) %Desplegado gráfico de resultados
        figure (1); plot(t*dt,S1,'.');hold on; plot(t*dt,S2,'.r');hold on;
        figure (2);plot(t*dt,X,'.');hold on;
    else
    end
end
end

```

Los resultados de la aplicación de este algoritmo exhiben el efecto diáuxico correspondiente a que los microorganismos consumen en todo momento al sustrato que les permite crecer más rápidamente. Por ejemplo con los datos reportados en el algoritmo anterior puede observarse que los microorganismos consumen primero al sustrato número 2 hasta que la velocidad de crecimiento de la población por consumo del primer sustrato supera a la que le proporciona el consumo del segundo sustrato; luego esto se invierte cuando la velocidad de crecimiento por el consumo del segundo sustrato vuelve a superar a la rapidez de crecimiento por consumo del primer sustrato:

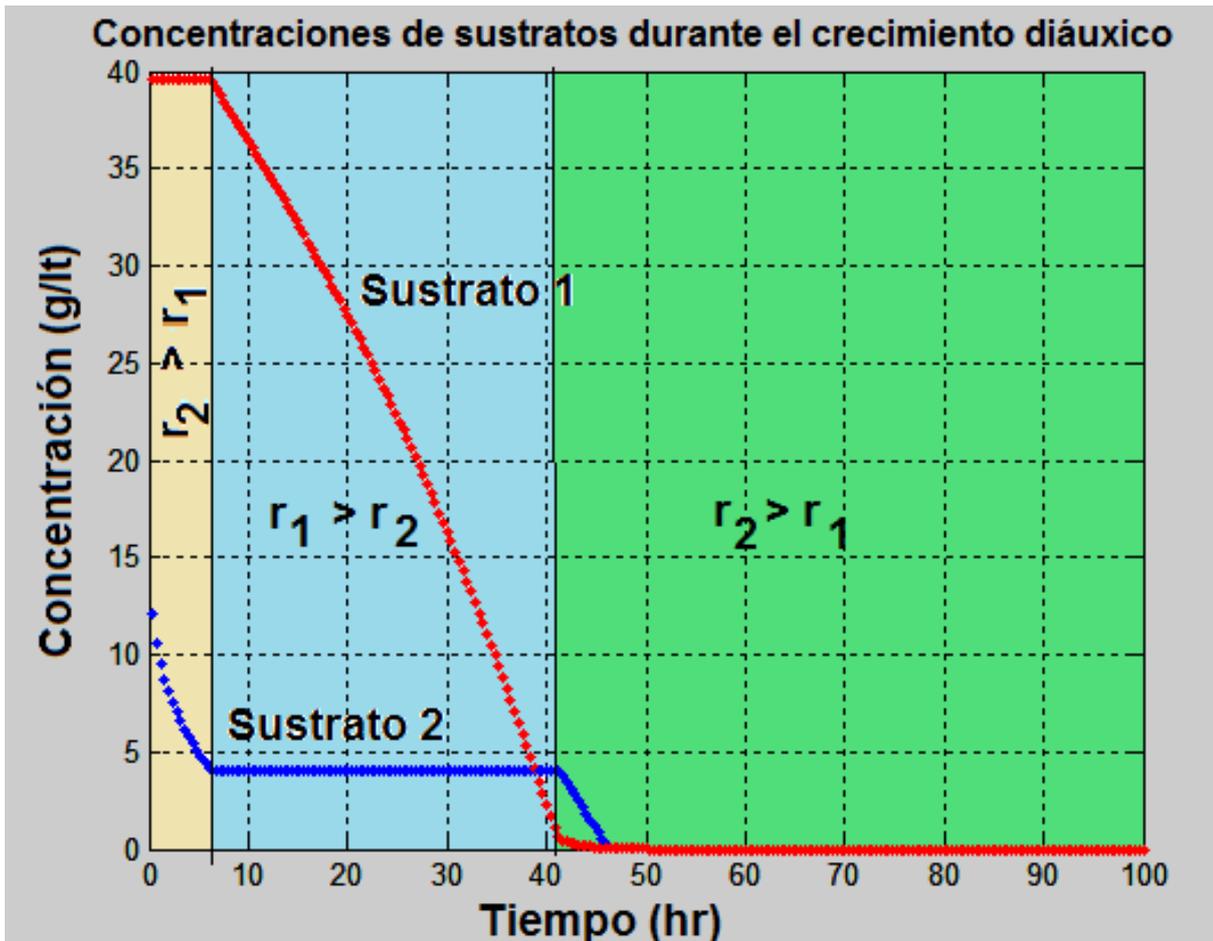


Figura 3.14 Evolución de las concentraciones de sustratos durante el crecimiento diáuxico.

La gráfica de la figura 3.15 muestra la evolución de la concentración de microorganismo durante el crecimiento diáuxico, mientras que en la figura 3.16 se presenta la evolución de los niveles enzimáticos intracelulares durante la simulación, resaltando el papel de las variables cibernéticas u_1 y u_2 sobre la síntesis de e_1 y e_2 .

Puede observarse que durante la primera fase de crecimiento, la variable cibernética u_1 adquiere valores muy cercanos a la unidad, indicando síntesis preferencial de la enzima 1 y represión de la síntesis de la enzima 2.

Después de que el primer sustrato está casi totalmente consumido, su rapidez de crecimiento cae a cero, disparando el cambio en las variables cibernéticas e induciendo la síntesis de la enzima 2.

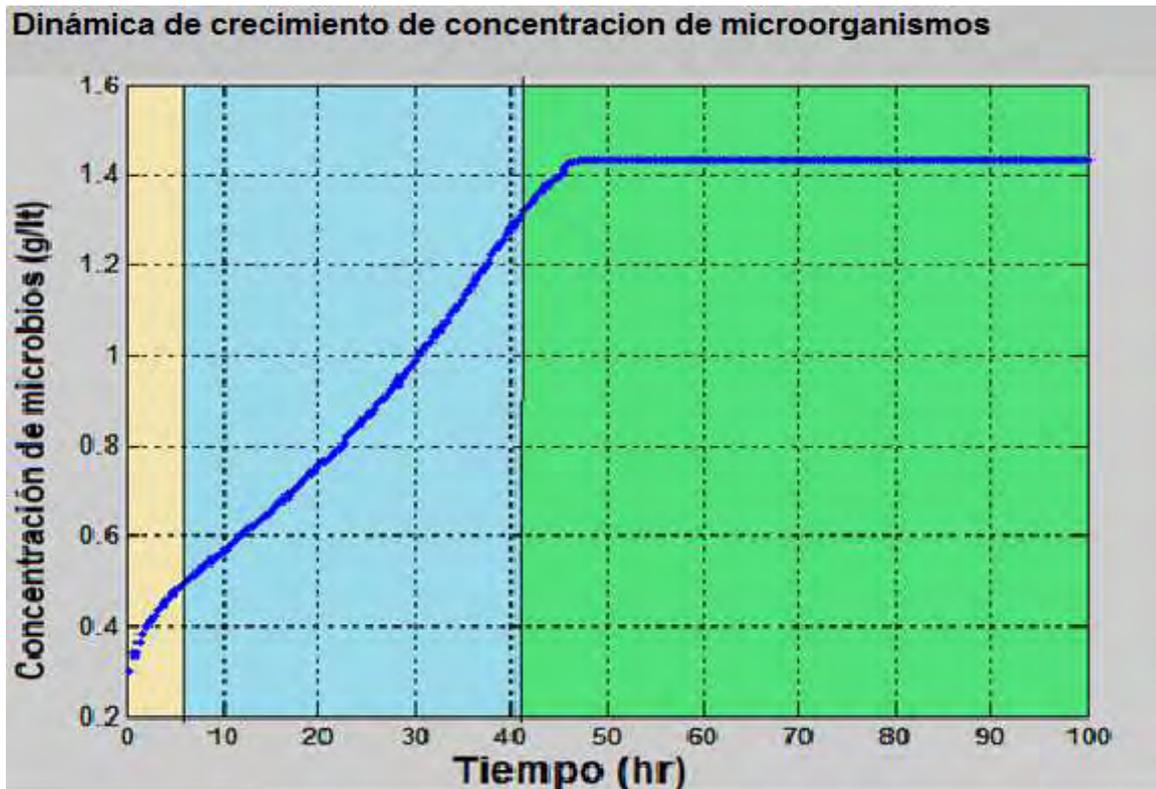


Figura 3.15 Evolución de la concentración de microorganismos durante el crecimiento diauxico.

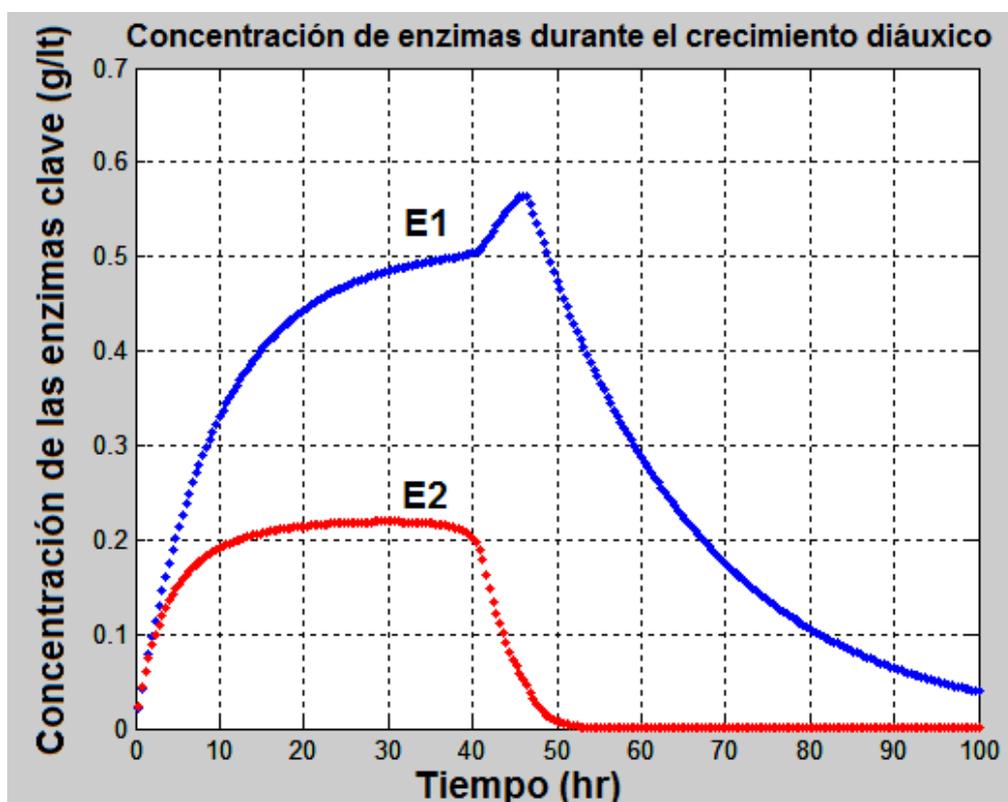


Figura 3.16 Gráfica de la concentración de las enzimas clave durante el crecimiento diáuxico.

3.10 Sistemas microbianos Depredador-presa

Frecuentemente los cultivos mezclados de bacterias desarrollan relaciones tipo depredador-presa. Unos microorganismos se comen a otros. El comportamiento dinámico de los sistemas depredador-presa ha sido estudiado desde principios del siglo XX, dentro de una amplia área de la física-matemática denominada “Dinámica de Sistemas no lineales”, a la cual han contribuido investigadores notables como los rusos Kolmogorov (premio nobel por sus contribuciones en estadística, turbulencia y los mismos sistemas dinámicos) y Lyapunov, con sus contribuciones en fractales y grupos de renormalización. A pesar de que el ejemplo que se presenta a continuación merecería un análisis bajo la teoría de los sistemas dinámicos no lineales, calculando el exponente de Lyapunov y la entropía de Kolmogorov, en esta tesis solo se simula su comportamiento dinámico sin realizar un análisis profundo. Sería muy interesante pero quizá correspondería a otro tema de tesis.

3.10.1 Dos microorganismos y un solo sustrato

Un ejemplo de sistemas microbianos depredador-presa, de interés en biotecnología, es el de la *Alcaligenes faecalis* (depredador) y la *Colpidium compilum* (presa). El ejemplo fue propuesto como ejercicio por Scott Fogler en el capítulo 7 de su libro “Essentials of Chemical Reaction Engineering”.

Considérense diferentes especies X_1 y X_2 , dentro de un quemostato. La célula X_1 solo come sustrato, mientras que las células X_2 solo comen microorganismos X_1 .

$X_1 + \text{sustrato} \rightarrow \text{Más células } X_1 + \text{producto } 1$

$X_2 + X_1 \rightarrow \text{más células } X_2 + \text{producto } 2$

Las rapidezces de crecimiento son:

$$r_{X1} = \frac{\mu_{max1} S}{K_{M1} + S} \text{ ----- (3.56)}$$

$$r_{X2} = \frac{\mu_{max2} X_1}{K_{M2} + X_1} \text{ ----- (3.57)}$$

Para este sistema:

$\mu_{max1} = 0.5 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{max2} = 0.11 \text{ h}^{-1}$; $K_{M1} = K_{M2} = 10 \text{ mg/litro}$; $Y_1 = Y_{X1/S} = 0.1$; $Y_2 = Y_{X2/X1} = 0.5$

3.10.2 Algoritmo de cómputo.

A continuación se presenta nuestro algoritmo de cómputo para este sistema depredador-presa dentro de un biorreactor CSTR. Se exploraron las condiciones de operación hasta obtener oscilaciones de todas las especies químicas y biológicas.

```
function bioreactormic
clear all;close all;clc;
km1=10;%Constante de Michaelis para primera reacción microbiana
km2=10;%Constante de Michaelis para segunda reacción microbiana
u1max=.5;%velocidad de crecimiento máxima para primera reacción microbiana
u2max=.11;%velocidad de crecimiento máxima para segunda reacción microbiana
yx1s=.14;% coeficiente estequiometrico microbio 1 /sustrato
ysx1=1/yx1s;% coeficiente estequiometrico sustrato/ microbio 1
yx2x1=.5;% coeficiente estequiometrico microbio 2 /microbio 1
yx1x2=1/yx2x1;% coeficiente estequiometrico microbio 1 / microbio 2
Cs0=250;% concentración inicial de producto dentro del reactor
d=0.004;% rapidez de dilución /1/tiempo de residencia)
dt=.1;nit=3500;% paso de tiempo y número total de intervalos
%concentraciones a la entrada del biorreactor
Cx1=25;% concentración de microorganismos 1
Cx2=7;% concentración de microorganismos 2
Cs=10;% concentración de sustrato
Cp=0;% concentración de producto en la alimentación
for t=1:nit
    rgx1=u1max*Cs*Cx1/(km1+Cs);% rapidez de crecimiento del microbio 1
    rgx2=u2max*Cx1*Cx2/(km2+Cx1);% rapidez de crecimiento del microbio 2
    Cs=Cs+dt*(d*(Cs0-Cs)-ysx1*rgx1);% rapidez de consumo de sustrato
    Cp=Cp+ dt*(d*(Cs0-Cs)+ysx1*rgx1);% rapidez de producción de producto
    Cx1=Cx1+dt*(d*(-Cx1)+rgx1-yx1x2*rgx2);% variación de concentración X1
    Cx2=Cx2+dt*(d*(-Cx2)+rgx2);% variación de concentración de X2
    contar =t/20;
    if((contar-ceil(contar))==0)
        figure (1)
        plot (t,Cs,'.');hold on;plot (t,Cp,'.r');hold on;
        figure (2)
        plot (t*dt,Cx1,'.r');hold on;plot (t*dt,Cx2,'.g');hold on;
    else
    end
end
```

3.10.3 Resultados: Oscilaciones de todas las especies

En la figura 3.17 se muestran los resultados de la ejecución de nuestro algoritmo:

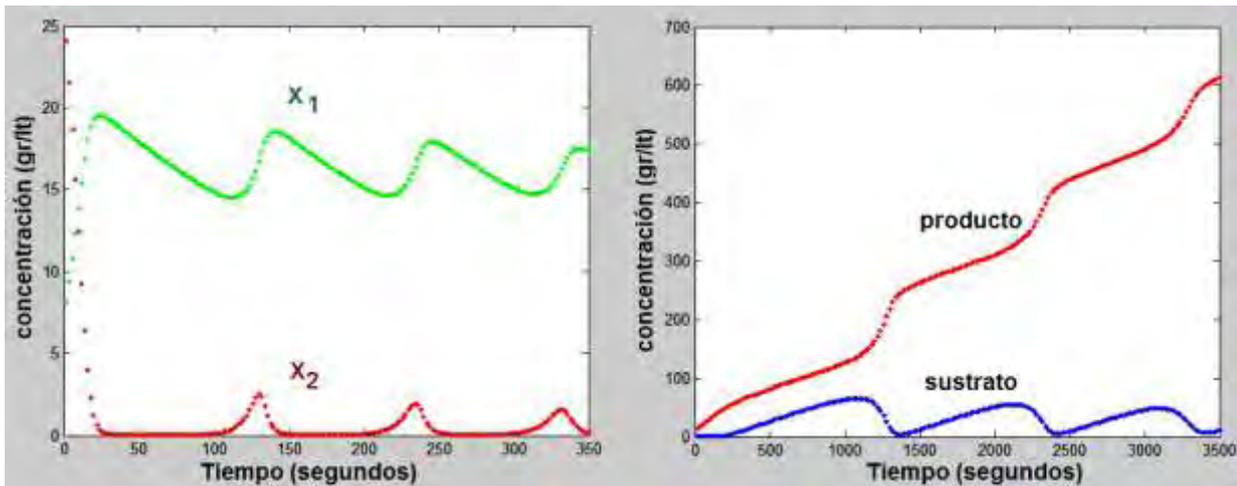


Figura 3.17 Evolución de la concentración de las cuatro especies dentro de un biorreactor CSTR.

Como puede observarse, este sistema depredador-presa da lugar a oscilaciones de las concentraciones de todas las especies. Cuando dichas oscilaciones aparecen en un biorreactor se puede optimizar la producción, como se podrá observar en el capítulo 5 para el caso de la *Zymomonas mobilis*.

3.11 Factores que afectan el crecimiento de la población celular

Los factores ambientales que tienen influencia sobre el crecimiento de la población microbiana son la temperatura y pH, principalmente; cabe mencionar que otros factores como la salinidad del medio, la concentración de oxígeno en procesos aerobios y la presión también pueden ser importantes.

3.11.1 Influencia de la temperatura

La temperatura del medio ambiente es importante para favorecer o impedir el crecimiento de la población de los microorganismos. Existe una temperatura de crecimiento adecuada para cada microorganismo.

Si se considera la rapidez de crecimiento de la población microbiana como función de la temperatura, se puede identificar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento cuasilíneo de la rapidez de crecimiento con la temperatura del cultivo, hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la rapidez es máxima. Por encima de esta temperatura, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la rapidez de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina **coeficiente de temperatura** a la relación entre el incremento de la

velocidad de reacción y la temperatura. En términos generales la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al incrementarse la temperatura en 10 °C.

La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan a de fluidos a geles cristalinos, impidiendo el funcionamiento de la membrana celular.

La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas.

Es importante tener en cuenta que a bajas temperaturas, el metabolismo celular es lento y las células dejan de crecer, aunque suelen morir. Sin embargo cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división aunque baje posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío.

Los microorganismos se clasifican en diferentes grupos de acuerdo a su comportamiento térmico; ellos pueden ser psicrófilos, mesófilos, termófilos, supertermófilos e hipertermófilos, dependiendo del intervalo de temperaturas en el que su crecimiento sea el óptimo, como puede observarse en la tabla 3.4 y en la figura 3.18 :

Tabla 3.4 Clasificación de microorganismos de acuerdo a su comportamiento térmico.			
Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínima	Óptima	Máxima
Termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 80
Mesófilos	10 a 15	30 a 45	35 a 47
Psicrófilos Obligados	-5 a 5	15 a 18	19 a 22
Psicrófilos Facultativos	-5 a 5	25 a 30	30 a 35

Fuente:Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:153528452

Los microorganismos psicrótrofos son mesófilos que pueden crecer a temperaturas bajas. Por tanto, se les puede considerar como psicrófilos facultativos. Esto es importante desde el punto de vista aplicado porque cuando se encuentran contaminando alimentos, son capaces de crecer en condiciones de refrigeración (4-8°C) y de producir infecciones en los consumidores del alimento (30-35°C).

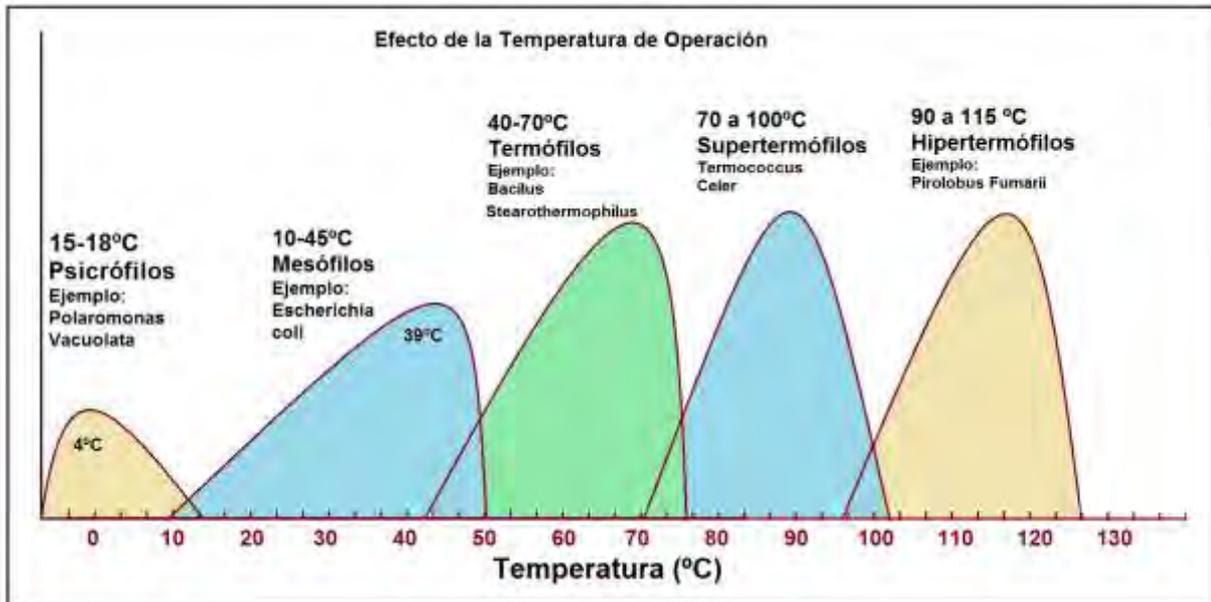


Figura 3.18 Clasificación de las bacterias en función del intervalo de temperatura que favorece su metabolismo y crecimiento.

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web: 153528452

Como puede observarse existe un máximo en el crecimiento de la población celular correspondiente a una temperatura ambiental óptima; dicho óptimo es diferente para cada microorganismo; como ejemplo se presente la gráfica del crecimiento de la Escherichia Coli.

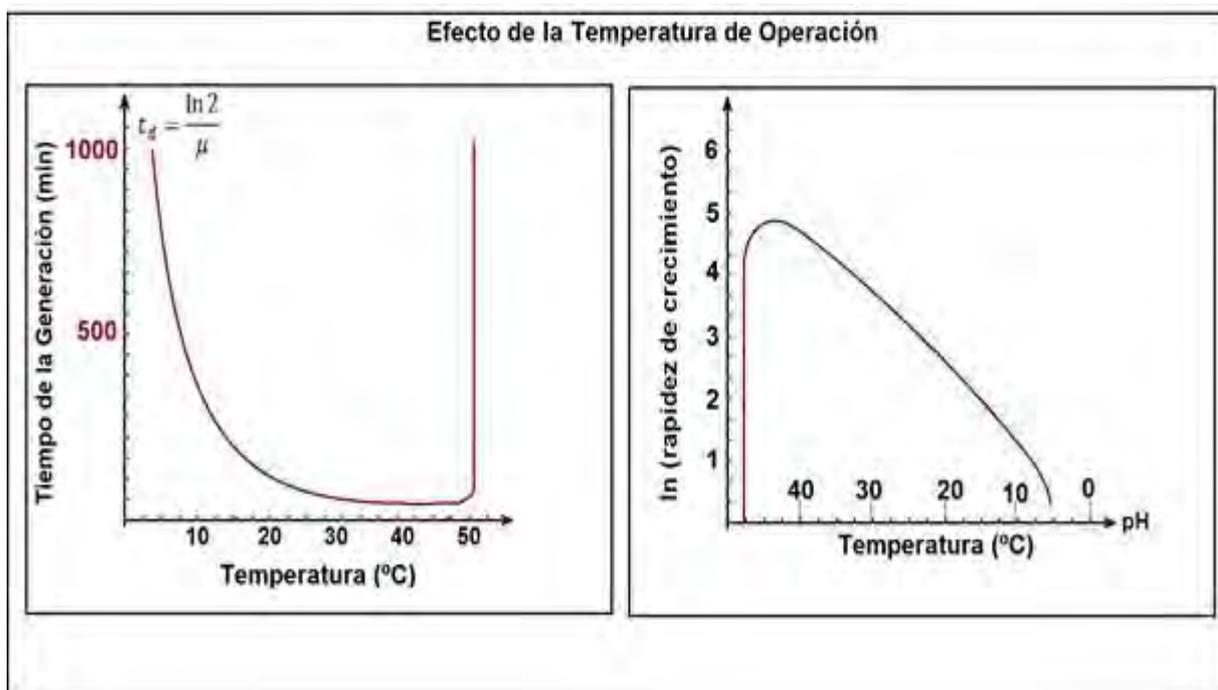


Figura 3.19 Efecto de la temperatura en el crecimiento de E. Coli.

Como puede observarse en este par de gráficas, existe una temperatura óptima que maximiza la rapidez de crecimiento de la población, que para el caso de la *Escherichia coli* es de 45°C. Cuando se diseña un biorreactor es conveniente tomar en cuenta la temperatura de operación óptima para el crecimiento de la población celular.

3.11.2 Influencia del pH

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango mueren.

El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplasmática. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el intervalo de 6.0 a 8.0.

Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son también distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH igual a 1 y otros alcalófilos que toleran pH de 10. Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el descenso del pH del medio que producen ciertos microorganismos, les confiere una ventaja selectiva frente a otros competidores. Por ejemplo: las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo, reducen el pH del medio a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras. De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante.

El efecto letal del pH ácido sobre los microorganismos tiene aplicación en la conservación de alimentos acidificándolos. De esta forma, la adición de ácido acético en forma de vinagre permite conservar alimentos perecederos (chiles y escabeches, por ejemplo) y la producción de ácidos en el curso de fermentaciones naturales permite alargar la vida de los alimentos (por ejemplo coles fermentadas).

La siguiente tabla muestra el pH que favorece a diferentes tipos de microorganismos:

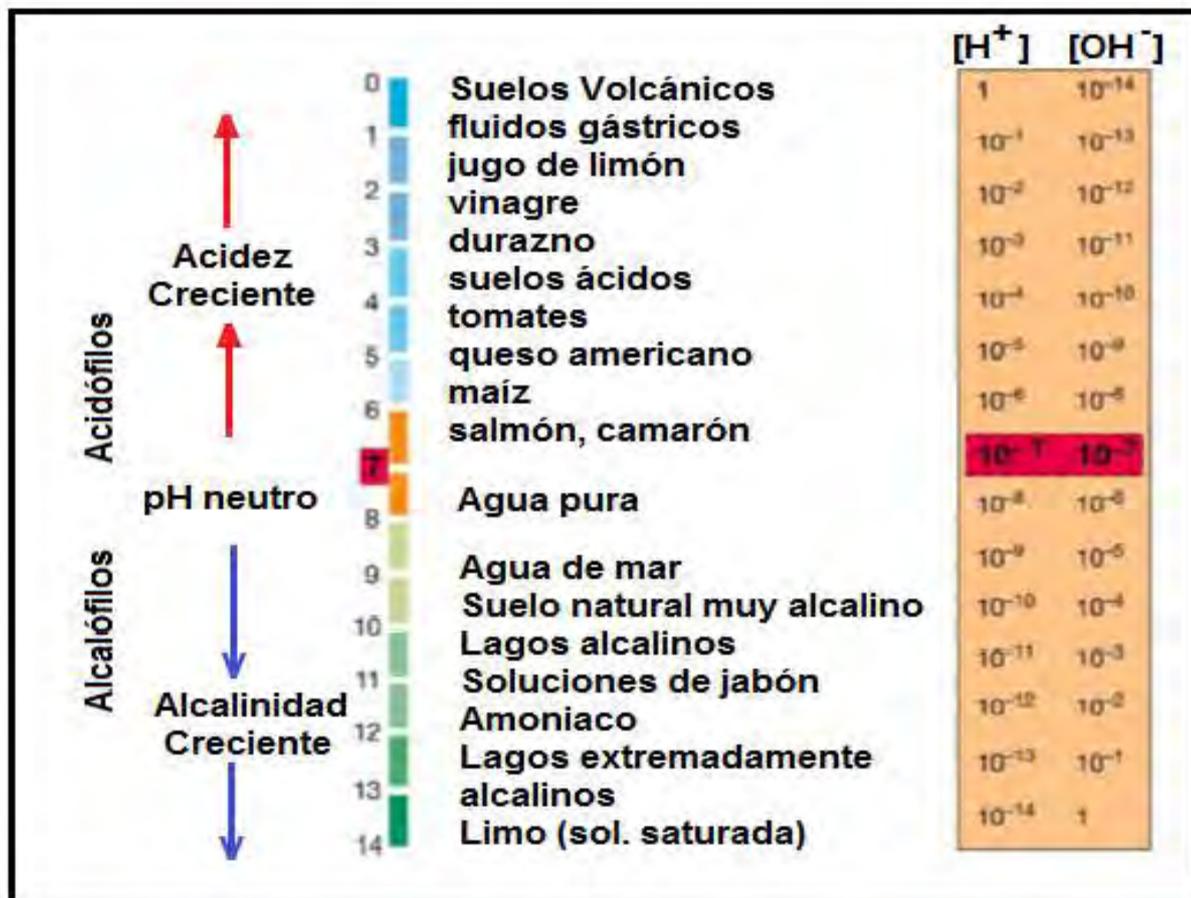


Figura 3.20 Clasificación de los microorganismos según su tolerancia al pH.

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web: 153528452

3.12 Otros modelos cinéticos. [1, 2, 3, 4]

A lo largo de la historia de la investigación de la cinética microbiana, se han propuesto varios mecanismos, con sus correspondientes modelos matemáticos. El más importante es el de Monod. De ahí se han derivado muchos de los demás. En las tablas 3.5 y 3.6 se reportan varios modelos cinéticos, que como se ve, la principal diferencia es la forma de expresar la rapidez de crecimiento específica de los microorganismos (μ). La idea original en este capítulo era formular algoritmos de cómputo y el análisis de los resultados para cada modelo, pero ello se puede encontrar en una tesis de licenciatura de Ingeniería Química, presentada a principios de 2016, por lo que mejor se prefirió analizar los fenómenos de crecimiento diáuxico y el sistema depredador-presa, por ser temas no tratados en la citada tesis. En estas tablas quizá falte el modelo hiperbólico generalizado de 2015, que es un intento por abarcar la mayoría de los modelos cinéticos reportados en las tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5 Otros modelos cinéticos		
Ecuación de Monod:	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$	(3.58)
Ecuación de Tessier:	$\mu = \mu_m \left(1 - \exp \left(- \frac{S}{K_s} \right) \right)$	(3.59)
Ecuación de Moser:	$\mu = \mu_m \left(\frac{S^n}{K_s + S^n} \right)$	(3.60)
Ecuación de Contois:	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{B X + S} \right)$	(3.61)

Tabla 3.5 Cinéticas que tienen en cuenta la inhibición por sustrato.

Ecuación de Andrews y Noack:	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_m}} \right)$	(3.62)
Ecuación de Webb:	$\mu = \mu_m \frac{S(1 + (B S)/K_m)}{K_s + S + \frac{S^2}{K_m}}$	(3.63)
Ecuación de Aiba y Colaboradores:	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \exp \left(- \frac{S}{K} \right)$	(3.64)
Ecuación de Tessier:	$\mu = \mu_m \left[\exp \left(- \frac{S}{K_m} \right) - \exp \left(- S/K_s \right) \right]$	(3.65)
Ecuación de Tseng y Wymann:	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) - K_m (S - S_C)$	(3.66)

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web: 153528452

Tabla 3.6 Cinéticas que tienen en cuenta la inhibición por parte del producto		
Ecuación de Dagley y Hinshelwood:	$\mu = \mu_0 \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - kP)$	(3.67)
Ecuación de Holzber y cols:	$\mu = \mu_m - k_1(P - k_2)$	(3.68)
Ecuación de Ghose y Tyagy:	$\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)$	(3.69)
Ecuación de Alba y Shoda:	$\mu = \mu_0 \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \exp(-kP)$	(3.70)
Ecuación de Jerusalimsky y Neronova:	$\mu = \mu_0 \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_\phi}{K_\phi + P} \right)$	(3.71)
Ecuación de Levenspiel:	$\mu = \mu_0 \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P^*} \right)^n$	(3.72)

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web: 153528452

Solo queda enfatizar en que los algoritmos de cómputo formulados en este capítulo, se podrían adaptar de manera relativamente fácil para cada uno de los modelos cinéticos reportados en estas dos últimas tablas, y luego buscar una aplicación práctica de la ingeniería en alimentos para diseñar el correspondiente biorreactor CSTR, batch o semibatch, o como se verá en capítulos posteriores, algún otro prototipo de biorreactor.

Por último, es importante señalar que los ajustes funcionales de los datos experimentales para obtener las expresiones cinéticas 3.58-3.72 y las cinéticas enzimáticas del capítulo previo, son desarrolladas por los investigadores para un determinado tipo de reactor. Por lo tanto, no es raro encontrar reportes de los parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae*, que difieren notablemente de un tipo de reactor a otro.

Aunque la cinética debería ser independiente de la dinámica del reactor, la forma en que se obtienen los datos empíricos y la propia naturaleza compleja de los sistemas químico-biológicos, provoca que ocurran tales diferencias. En los capítulos que restan se supondrá que los datos cinéticos obtenidos en biorreactores batch o CSTR pueden ser aplicados a otro tipo de biorreactores, es decir, que la cinética si es independiente de la dinámica.

Bibliografía

[1] Aiba, S.; Humphrey, A. E.; Millis, N. F. (1973). *Biochemical Engineering*, 2nd edition. Academic Press.

[2] Fogler, H. Scott (2011). *Essentials of Chemical Reaction Engineering*. Prentice Hall.

[3] Villadsen, John; Nielsen, Jens; Lidén, Gunnar. (2013) *Bioreaction Engineering Principles*, Third Edition. Springer.

[4] Doran, Pauline.(2013) *Bioprocess Engineering*, 2nd edition. Academic Press. Elsevier

[5] Saha, Goutam; Barua, Alok; Sinha, Satyabroto. (2016). *Bioreactors, Animal Cell Culture Control for Bioprocess Engineering*. CRC Press

[6] Simpson, Ricardo; Sastry, Sudhir K. (2013). *Chemical and Bioprocess Engineering*. Springer. Libro de texto con ejercicios.

Capítulo 4

Biorreactores Enzimáticos

Resumen

En la parte medular de este capítulo se lleva a cabo el diseño de un par de biorreactores enzimáticos. El primero de ellos corresponde a un reactor tubular con dispersión axial. Primeramente, se realiza el análisis matemático mediante series de Fourier para obtener la solución exacta de la ecuación de reacción-difusión-convección para cinéticas de primer orden y orden cero; pudiendo utilizarse, por lo tanto, para biorreactores enzimáticos Michaelianos bajo condiciones en que $K_M \gg S$ y $K_M \ll S$, respectivamente. Dicha solución exacta se utiliza también como parámetro de comparación para probar la exactitud de las aproximaciones numéricas por diferencias finitas y por autómatas celulares en retículas de Boltzmann. El segundo biorreactor analizado (podría ser enzimático o microbiano) corresponde a un biorreactor de lecho fijo con enzima inmovilizada en el interior de pellets esféricos. Nuevamente se inicia resolviendo analíticamente la ecuación de difusión transitoria en coordenadas esféricas mediante series de Fourier, contra la cual se comparan las soluciones numéricas por diferencias finitas y redes de Boltzmann.

Como resultado del análisis para ambos tipos de reactores, se encontró que la aproximación más exacta es la de la red de Boltzmann. En general se puede decir que las retículas de Boltzmann proveen de la exactitud de los métodos implícitos, como los elementos finitos y los elementos espectrales, pero son fáciles de programar como los esquemas numéricos explícitos, lo cual se puede observar en los códigos formulados para este trabajo. Las principales aportaciones de esta tesis son precisamente el análisis matemático que no hemos encontrado en ningún documento científico reciente y la introducción de las redes de Boltzmann en aplicaciones prácticas de la ingeniería en alimentos.

Por supuesto el capítulo inicia describiendo las ecuaciones de diseño de biorreactores enzimáticos ideales, aquéllos en los que no existen problemas difusionales ni sistemas hidrodinámicos complejos. Se consideran reactores tipo batch, CSTR y PFR, operando en estado estacionario. Luego se explica cómo optimizar tiempos de residencia de arreglos de biorreactores CSTR y PFR en serie, para finalizar con el diseño de los dos tipos de reactores no ideales mencionados líneas arriba.

4.1 Reactores ideales

Los reactores ideales son aquéllos en los que dominan los efectos cinéticos sobre los fenómenos difusionales y sobre la hidrodinámica del sistema. Los biorreactores enzimáticos ideales pueden ser de tres tipos:

- Reactor batch de tanque perfectamente agitado (BSTR), analizado ya en capítulos 2 y 3
- Reactor continuo de tanque agitado (CSTR)
- Reactor semibatch
- Reactor de flujo en pistón (PFR)

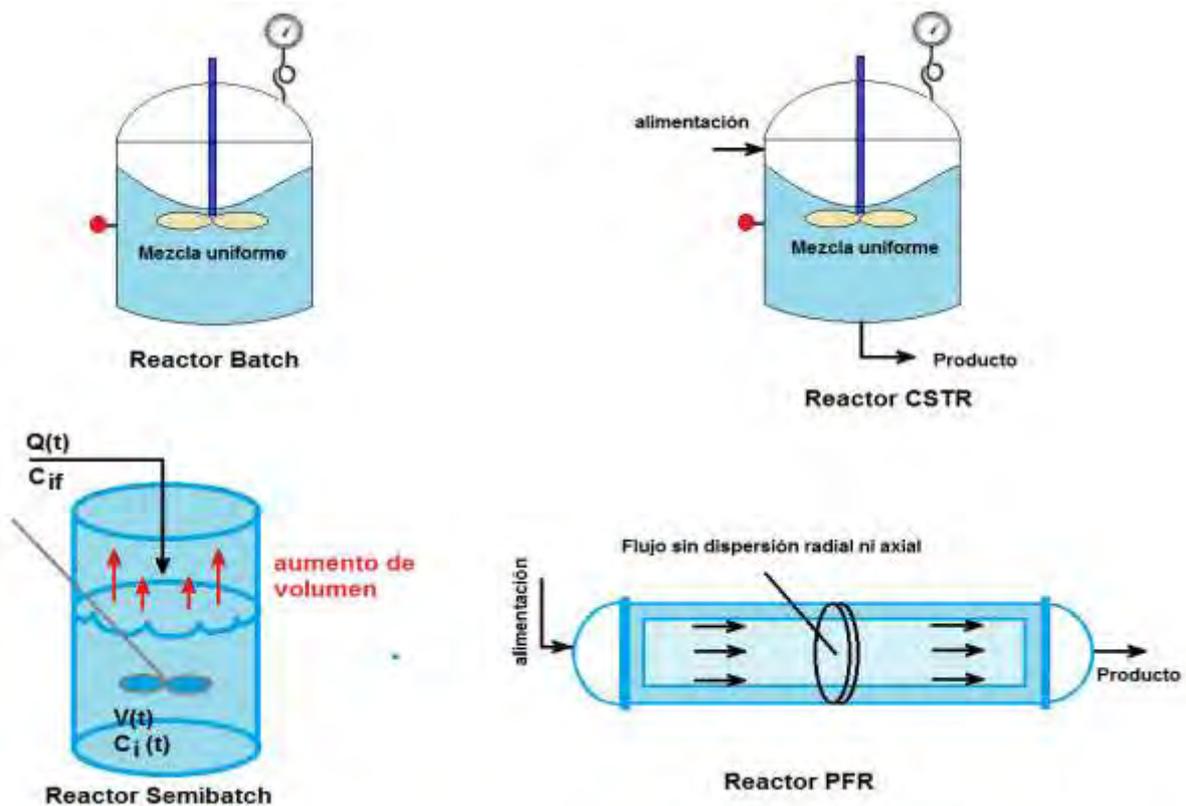


Figura 4.1 Representación esquemática de los diferentes tipos de Reactores Ideales

En seguida se describe matemáticamente el comportamiento de cada uno de ellos:

4.1.1 Reactores batch de tanque agitado

Comúnmente los reactores batch operan colocando el biocatalizador dentro de él, añadiendo rápidamente toda la carga de sustrato y agitando vigorosamente, de manera tal que el contenido del reactor es homogéneo en todo momento. Las concentraciones de sustrato y producto varían con el tiempo. La ecuación de diseño para este tipo de reactores corresponde a la expresión cinética:

Para el sustrato, siguiendo una cinética de Michaelis-Menten:

$$-V \frac{dS}{dt} = \frac{kES}{k_M + S} \quad \text{--- (4.1)}$$

Esta ecuación diferencial ordinaria que ya ha sido comentada en capítulos anteriores, puede ser fácilmente integrada para obtener la evolución de la concentración del sustrato:

$$\frac{-V}{kE} \left[k_M \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) + (S - S_0) \right] = t \quad \text{--- (4.2)}$$

En términos de conversión ($S = S_0 [1-x]$):

$$\frac{kE}{V} t = xS_0 - k_M \ln(1 - x) = k\tau \quad \text{--- (4.3)}$$

Donde k es la rapidez máxima de reacción, k_M es la constante de Michaelis para el sistema de enzima inmovilizada y E es la concentración total de enzima dentro del reactor. El cociente Et/V es el tiempo de residencia normalizado, factor que permite una rápida comparación respecto a la eficiencia de diferentes tipos de reactor.

Cuando existe inhibición por parte del sustrato o del producto, el comportamiento del reactor se ve significativamente modificado; en la tabla 4.1 se resumen los tiempos de residencia para diferentes casos.

Tabla 4.1 Expresiones cinéticas y tiempos de residencia en Biorreactores enzimáticos batch operando en régimen estacionario

Modelo Cinético	Expresión cinética (r)	Tiempo de residencia (τ), para reactores Batch y PFR	Ecuación
Michaelis-Menten	$r = \frac{kE}{1 + \frac{K_M}{S}}$	$\tau = \frac{1}{k} (xS_0 - K_M \ln[1 - x])$	(4.4a y b)
Michaelis-Menten reversible	$r = \frac{kE}{\frac{k_M + S + P \frac{K_M}{K_P}}{S - P \frac{K_M}{K_P}}}$	$\tau = \frac{x_{eq} S_0}{k} \left[x \left(1 - \frac{K_M}{K_P} \right) + \left(\frac{K_M}{S_0} + 1 - x_{eq} + x_{eq} \frac{K_M}{K_P} \right) \ln \frac{x_{eq}}{x_{eq} - x} \right]$	(4.5 a y b)
Inhibición por parte del sustrato	$\frac{kE}{1 + (K_M + S) + \frac{S}{K_S}}$	$\tau = \frac{1}{k} \left[xS_0 - K_M \ln(1 - x) + \frac{S_0^2}{2K_S} (2x - x^2) \right]$	(4.6 a y b)
Inhibición competitiva Por parte del producto	$r = \frac{kE}{\frac{K_M}{S} \left(1 + \frac{P}{K_P} \right)}$	$\tau = \frac{1}{k} \left[xS_0 \left(1 - \frac{K_M}{K_P} \right) - K_M \left(1 + \frac{S_0}{K_P} \right) \ln(1 - x) \right]$	(4.7 a y b)

4.1.2 Reactor de Flujo en Pistón, PFR

Este tipo de reactores es caracterizado por un flujo continuo de la mezcla reaccionante con un perfil plano de velocidad; las concentraciones de los diferentes componentes varían axialmente desde la entrada hasta la salida del reactor, pero no hay cambio en dirección radial. La concentración del sustrato disminuye a lo largo del reactor mientras que la concentración del producto aumenta progresivamente. La ecuación de diseño de este tipo de reactores para operación en estado estacionario es:

$$\frac{V}{Q} = \tau = \int_{x_{entrada}}^{x_{salida}} \frac{dx}{-r} \quad (4.8)$$

Los tiempos de residencia para este tipo de reactores son iguales a los de los reactores batch reportados en la tabla 4.1.

4.1.3 Reactores de flujo continuo de tanque agitado

Son reactores que consisten en tanques perfectamente agitados en los que se introducen los reactivos y se extraen los productos de manera continua, comúnmente manteniendo el volumen invariable. La ecuación de diseño para este tipo de reactores es:

$$\frac{V}{Q} = \tau = \frac{\Delta x}{-r} = \frac{x_{salida} - x_{entrada}}{-r|_{x_{salida}}} \quad (4.9)$$

Los tiempos de residencia para la operación continua de un CSTR, considerando diferentes cinéticas, se resumen en la siguiente tabla, tomando en cuenta operación en régimen estacionario y con una conversión igual a cero a la entrada del biorreactor:

Tabla 4.2 Modelos cinéticos con inhibición por parte del sustrato e inhibición competitiva por parte del producto y tiempos de residencia correspondientes.			
Modelo Cinético	Expresión cinética (r)	Tiempo de residencia (τ), para reactores CSTR	Ecuación
Michaelis-Menten	$r = \frac{kE}{1 + \frac{K_M}{S}}$	$\tau = \frac{1}{k} \left(xS_0 + K_M \frac{x}{1-x} \right)$	(4.10)
Michaelis-Menten reversible	$r = \frac{kE}{\frac{k_M + S + P \frac{K_M}{K_P}}{S - P \frac{K_M}{K_P}}}$	$\tau = \frac{x_{eq} x}{k(x_{eq} - x)} \left[K_M + S_0(1-x) + S_0 \frac{K_M}{K_P} x \right]$	(4.11)
Inhibición por parte del sustrato	$\frac{kE}{1 + (K_M + S) + \frac{S}{K_S}}$	$\tau = \frac{1}{k} \left[xS_0 + K_M \frac{x}{1-x} + \frac{S_0^2}{K_S} (x - x^2) \right]$	(4.12)
Inhibición competitiva Por parte del producto	$r = \frac{kE}{\frac{K_M}{S} \left(1 + \frac{P}{K_P} \right)}$	$\tau = \frac{1}{k} \left[xS_0 + K_M \frac{x}{1-x} + \frac{K_M S_0 x^2}{K_P (1-x)} \right]$	(4.13)

Fuente: Universidad del Valle de México, Jhair Godoy. Página web:153528452

4.1.4 Comparación del comportamiento de reactores enzimáticos ideales

A partir de las expresiones de los tiempos de residencia para cada reactor, se puede llevar a cabo la selección del reactor más adecuado para una conversión dada. Como puede encontrarse en cualquier libro de texto de ingeniería de reactores, cuando se tiene una cinética de orden cero, la conversión en los reactores CSTR y PFR son idénticas, para el mismo tiempo de residencia. Para cinética de orden uno, el PFR exhibe un mejor comportamiento que el CSTR, al requerirse un menor tiempo de residencia para la misma conversión:

Para cinética de primer orden, el tiempo de residencia en un CSTR está dado por:

$$k\tau_{CSTR} = \left(\frac{x}{1-x}\right)_{CSTR} ; \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (4.14)$$

Mientras que el tiempo de residencia en un PFR con reacción de primer orden es:

$$k\tau_{PFR} = [-\ln(1-x)]_{PFR} \text{---} \text{---} \text{---} (4.15)$$

El siguiente algoritmo permite llevar a cabo una comparación entre los tiempos de residencia de los dos tipos de biorreactores, graficando las ecuaciones (4.14) y (4.15), como se muestra en la figura 4.2:

```
function comparacncstrpfr1erorden
clear all;close all; clc;
nx=100;dx=.01;f(1:nx)=0;g(1:nx)=0;
x(1:nx)=0;f1(1:nx)=0;g1(1:nx)=0;
for i=1:nx;x(i)=(i-1)*dx;end
for i=1:nx
    f(i)=x(i)/(1-x(i));f1(i)=log(f(i));
    g(i)=-log(1-x(i));g1(i)=log(g(i));
end
plot(x,f1,'.-');
hold on;plot(x,g1,'.-r');
hold on;grid on;
```

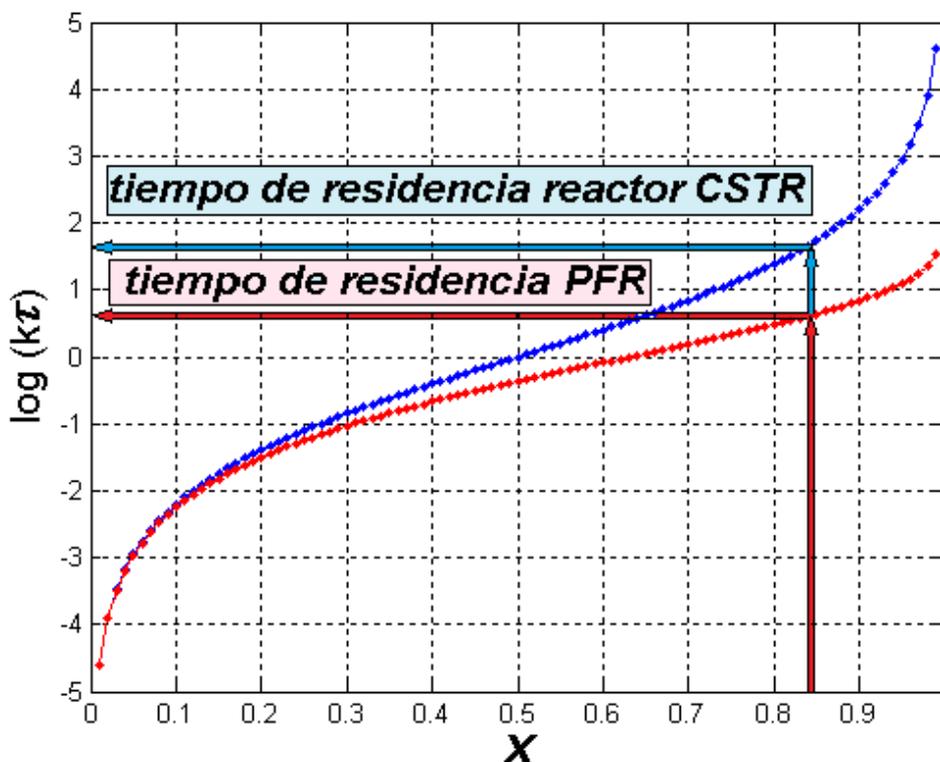


Figura 4.2 Gráfica comparativa de los tiempos de residencia en reactores CSTR y PFR, para cinética de primer orden.

Para cinética de Michaelis-Menten, al comparar las ecuaciones de los tiempos de residencia y graficar el tiempo de residencia en el CSTR contra el tiempo de residencia en el PFR, se observa que nuevamente conviene un reactor de flujo en pistón. El siguiente programa permite hacer dicha comparación, con base en las ecuaciones:

$$k\tau_{CSTR} = \left(xS_0 + K_M \frac{x}{1-x} \right) \text{ --- (4.16) } ;$$

$$k\tau_{PFR} = (xS_0 - K_M \ln[1-x]) \text{ --- (4.17)}$$

```

function comparacncstrpfrmichaelismenten
clear all; close all;clc;
S0=1;%concentración inicial de substrato
dx=.01;%distancia internodal para reactor pfr
nx=101;%número total de nodos para el reactor pfr
x(1:nx)=0;%dimensionamiento vector de conversiones fraccionarias
taustr(1:nx)=0;%dimensionamiento vector de tiempo de residencia para CSTR
taupfr(1:nx)=0;% dimensionamiento vector de tiempo de residencia para PFR
for k=1:4
    Km=.25*k;% 4 diferentes valores de la constante de Michaelis
    for i=1:nx
        x(i)=(i-1)*dx;% especificación de conversión fraccionaria
        taustr(i)=x(i)*S0+Km*x(i)/(1-x(i));%tiempo de residencia CSTR
        taupfr(i)=x(i)*S0-Km*log(1-x(i));% tiempo de residencia PFR
    end
    plot (taustr,taupfr,'-');hold on;%desplegado gráfico
end
grid on;

```

Los resultados de la ejecución de este programa se presentan en la siguiente figura, considerando una concentración inicial de substrato $S_0 = 1M$ y una constante de Michaelis-Menten, K_M , con valores de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 M.

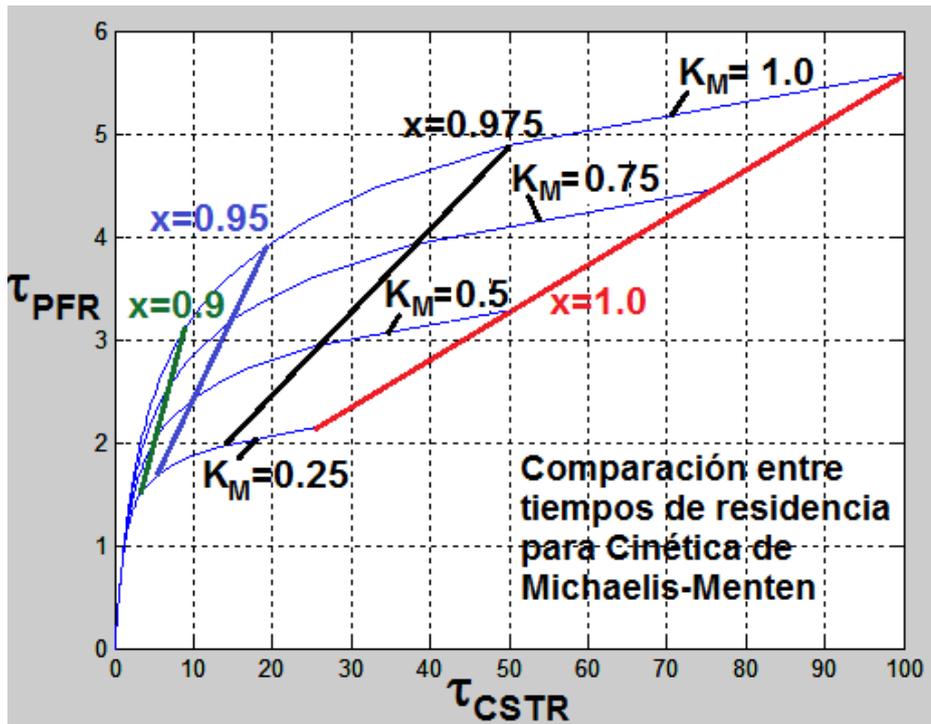


Figura 4.3 Gráfica comparativa de tiempos de residencia en reactores CSTR y PFR, para cinética de Michaelis-Menten.

4.1.5 Optimización de arreglos de biorreactores enzimáticos CSTR y PFR en serie

La visualización gráfica de las curvas de operación y el análisis cualitativo de dichas curvas en régimen estacionario, pueden ser útiles para elegir un esquema de operación, como se ejemplifica con la siguiente figura:

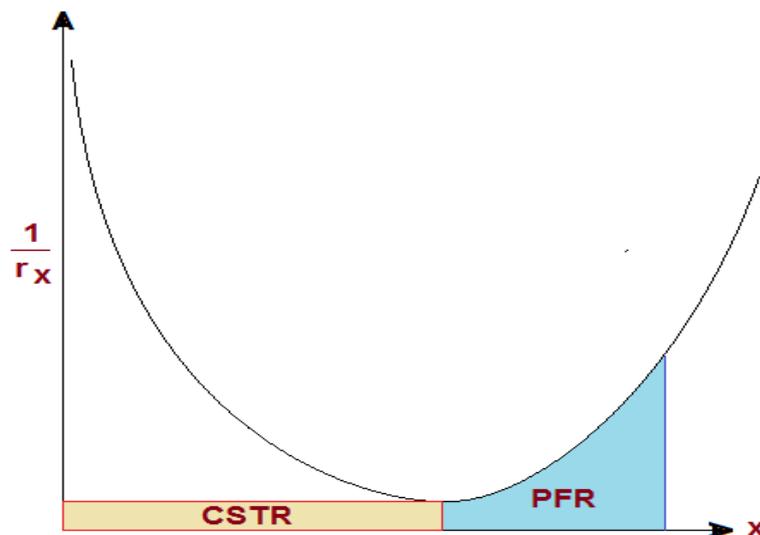


Figura 4.4 Diagrama del recíproco de la rapidez de reacción contra la conversión, para condiciones de estado estacionario. El área bajo la curva corresponde al volumen del reactor.

Este diagrama del recíproco de la rapidez de la reacción enzimática contra la conversión es muy útil, para minimizar el tiempo de residencia dentro de los biorreactores a utilizar. Como los reactores de mezcla completa ideales (CSTR) operan con una concentración dentro del reactor igual a la concentración de salida, el tiempo de residencia en tales equipos gráficamente corresponde al área del rectángulo formado con la rapidez de reacción a la concentración de salida como altura y la variación de la concentración (Δx) como longitud de la base; en cambio, para un PFR el tiempo de residencia corresponde al área bajo la curva. En la figura anterior la combinación óptima de biorreactores enzimáticos corresponde a la señalada con color, cualquier otra combinación un área bajo la curva más grande y por lo tanto y mayor tiempo de residencia más largo.

Si se utilizase un solo PFR, el tiempo de residencia sería muy grande (tendiendo a infinito si se iniciase con $x_0 = 0$); si se usase un solo CSTR, el volumen sería mayor que el óptimo posible, como puede observarse en la siguiente figura:

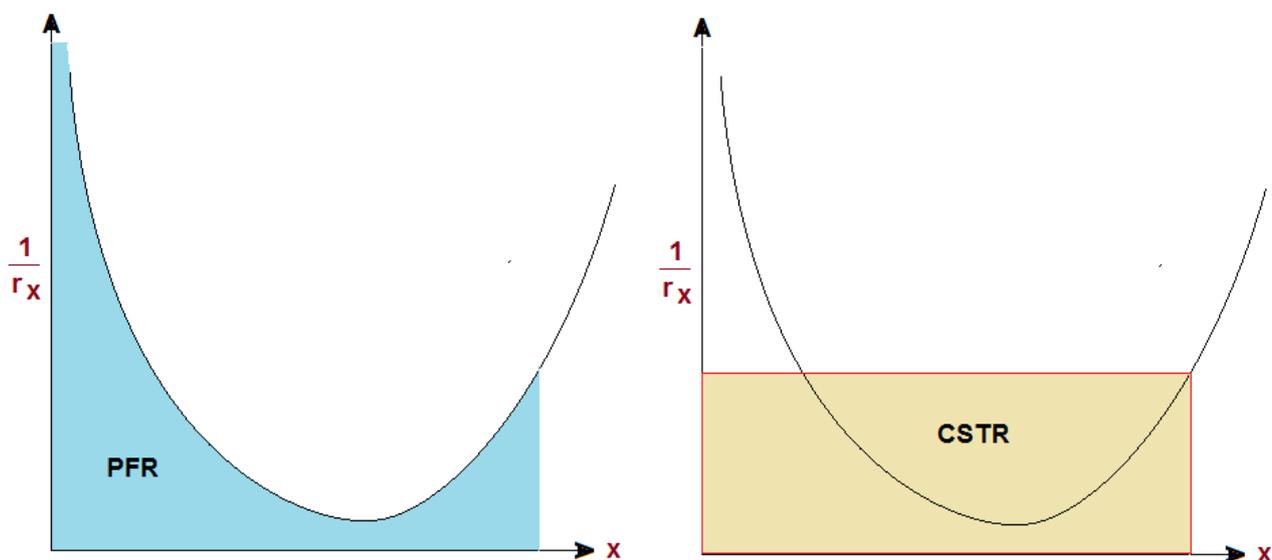


Figura 4.5 Diagrama del recíproco de la rapidez de reacción contra conversión para reactores PFR y CSTR

Entonces, el mínimo tiempo de residencia se obtiene al combinar un biorreactor de mezcla completa seguido de un PFR, como en la figura 4.4

4.1.6 Biorreactores semibatch.

Un reactor semibatch (SBR) es una variación de un reactor batch, en el sentido de que se introducen una o más corrientes de alimentación, pero sin permitir que exista una corriente de efluentes, por lo que el volumen del biorreactor se incrementa continuamente con el tiempo. La operación empieza con un volumen y concentración

inicial de reactivos. La alimentación, que contiene inhibidores, precursores, reactivos o nutrientes, se introduce intermitentemente o continuamente al reactor, hasta que éste se llena, y la operación continua en modo batch hasta que se alcanza la conversión deseada. Los SBR son equipos flexibles que ofrecen un método excelente de manipular las condiciones de reacción, mediante la sincronización de las corrientes de alimentación. En procesos de fermentación y biotecnología, a este tipo de unidades se le conoce más comúnmente como cultivos batch alimentados (fed batch culture) y tiene una gran variedad de aplicaciones prácticas. De hecho muchos de los procesos de fermentación y de cultivo celular industrialmente importantes se llevan a cabo en forma semibatch.

Al aplicar el balance infinitesimal de materia para este proceso, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dt}(C_i V) = Q C_i + r_i V \text{ --- (4.18)}$$

El término del lado izquierdo representa la rapidez de cambio del número de moles de la especie i dentro del reactor; dicho cambio se debe a la rapidez con la que entra dicha substancia contenida en la corriente de alimentación que fluye con un flujo volumétrico Q , y a la rapidez con la que se lleva a cabo la conversión catalizada enzimáticamente $r_i V$. Llevando a cabo la derivada del producto del lado izquierdo, se obtiene:

$$C_i \frac{d}{dt} V + V \frac{d}{dt} C_i = Q C_{if} + r_i V \text{ --- (4.19)}$$

Como el flujo volumétrico es igual a dV/dt , esta ecuación puede ser escrita como:

$$V \frac{d}{dt} C_i = Q(C_{if} - C_i) + r_i V \text{ --- (4.20)}$$

Como ejemplo se considera un biorreactor semibatch dentro del cual se lleva a cabo una reacción enzimática cuya cinética corresponde a la de Michaelis-Menten. Para este caso, las ecuaciones diferenciales gobernantes son:

Para el substrato:

$$V \frac{d}{dt} S = Q(S_f - S) - \frac{kES}{K_M + S} V \quad \text{--- (4.21)}$$

Para el producto:

$$V \frac{d}{dt} P = Q(P_f - P) + \frac{kES}{K_M + S} V \quad \text{--- (4.22)}$$

En el algoritmo que se presenta a continuación se supone que el volumen de la mezcla reaccionante empieza a aumentar conforme procede la reacción y que en el momento que se alcanza el volumen máximo, se elimina la corriente de alimentación de sustrato puro, operando desde ese momento en forma de un reactor batch sin alimentación.

```

function semibatchevita
clear all; close all; clc;
nit=10000;dt=0.01;%número de intervalos de tiempo totales y paso del tiempo
vo1=0.1;%volumen inicial del reactor ocupado por la mezcla reaccionante
vf=.15;%volumen final del reactor
sf=1e-4;%concentración de sustrato en la corriente de alimentación
so=4e-4;%concentración inicial del sustrato dentro del reactor
po=0;%concentración inicial del producto dentro del reactor
k=1e-5;%coeficiente cinético
km=1e-4;%constante de Michaelis-Menten
q0=0.00025;%flujo volumétrico de la corriente de entrada
s=so;p=po;%condiciones iniciales dentro del reactor
for m=1:4
    q=m*q0;s=so;p=po;vo=vo1;
    for t=1:nit
        tiempo=t*dt;v=q*tiempo+vo;%cálculo del volumen del reactor
        if (v<vf)
            s=s+dt*(q*(sf)/v-k*s/(km+s));%cálculo de la conc del sustrato
            p=p+dt*(q*(-p)/v+k*s/(km+s));%cálculo de la conc del producto
            %contotal =(s+p);%cálculo de la concentración total
            %s=s/contotal;p=p/contotal;%normalización de las concentraciones
        else
            q=0;v=vf;vo=vf;%operación batch
            s=s+dt*(-k*s/(km+s));%cálculo de la concentración del sustrato
            p=p+dt*(k*s/(km+s));%cálculo de la concentración del producto
        end
        %desplegado gráfico
        contar =t/20;%núm de intervalos de tiempo entre gráfica y gráfica
        if (contar-ceil(contar))==0)
            figure (1);
            if (m==1)
                plot (tiempo,s,'.b');hold on;plot (tiempo,p,'.b');hold on;
            end
        end
    end
end

```

```

else
  if (m==2)
    plot (tiempo,s,'.r');hold on;plot (tiempo,p,'.r');hold on;
  else
    if (m==3)
      plot (tiempo,s,'.k');hold on;plot (tiempo,p,'.k');hold on;
    else
      plot (tiempo,s,'.g');hold on;plot (tiempo,p,'.g');hold on;
    end
  end
end
end
end
end
end

```

En la serie de instrucciones se especifican 4 flujos volumétricos para la operación semibatch, correspondientes a 0.25, 0.50, 0.75 y 1 lt/seg.

Los resultados de la ejecución de este programa se muestran a continuación:

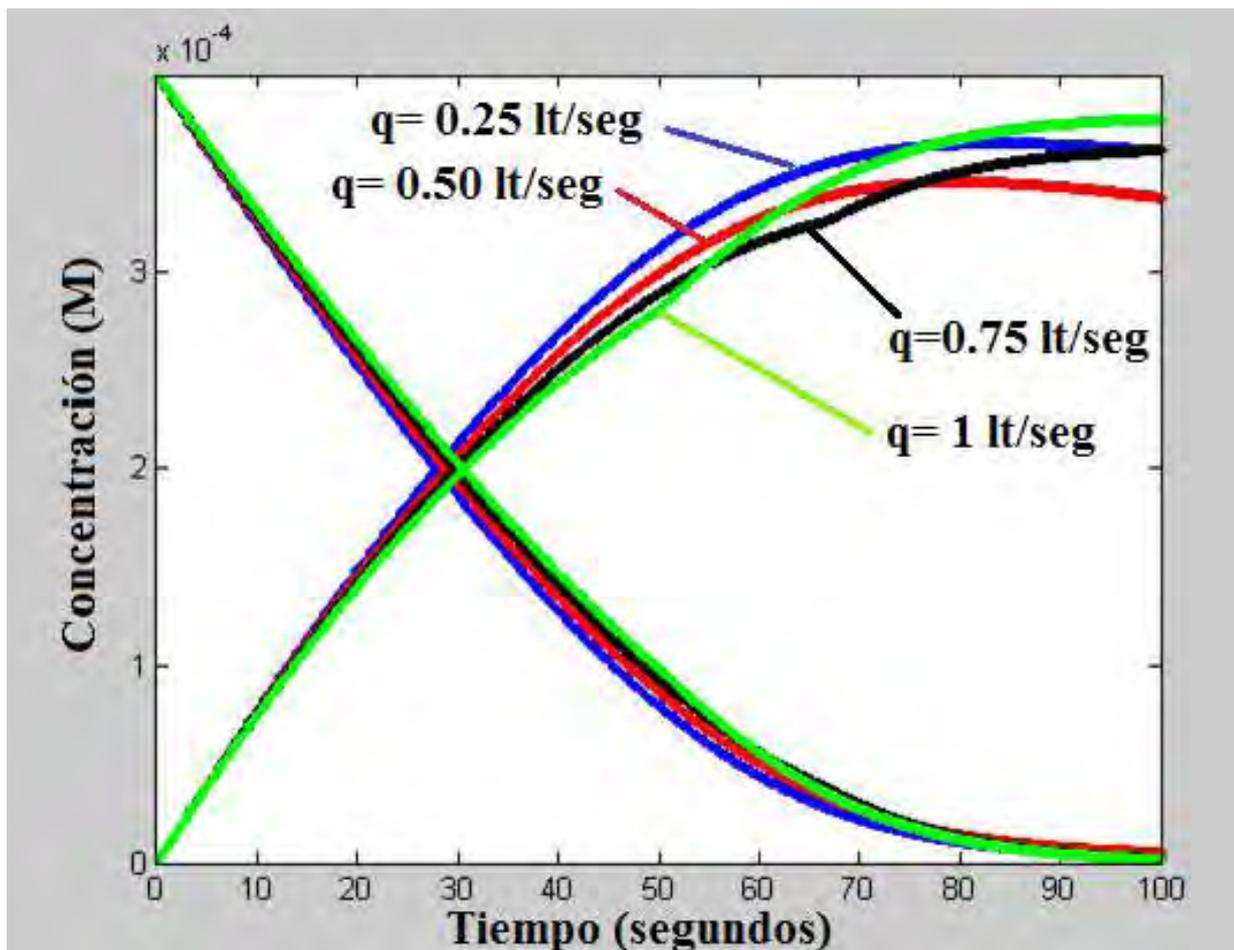


Figura 4.6 Evolución de las concentraciones de sustrato y producto en un reactor semibatch para cinética de Michaelis-Menten.

Cuando el reactor opera a 0.25 y 0.50 lt/seg, En el intervalo de tiempo graficado se puede observar una tendencia creciente de la concentración de producto, debido a que la rapidez de producción por reacción química supera a la rapidez de dilución. Pero, después de alcanzarse un máximo, la concentración de producto empieza a descender, pues la dilución es cada vez más importante que la velocidad de reacción.

En las curvas correspondientes a 0.75 y 1 lt/seg, se puede observar una tendencia monótona en el crecimiento de la concentración de producto, pero se puede notar un cambio en la rapidez de cambio de la concentración del producto, correspondiente al momento en que se alcanza de volumen máximo del reactor.

4.2 Reactores enzimáticos no ideales

Cuando los efectos difusionales son significativos, las ecuaciones de diseño pueden ser modificadas introduciendo el concepto de factor de efectividad (η) en la expresión cinética. Por ejemplo, para la cinética de Michaelis-Menten:

$$r = \eta \frac{kE}{1 + \frac{K_M}{S}} \text{ --- (4.23)}$$

Este factor de efectividad es de naturaleza empírica.

Para reactores CSTR η es espacialmente invariante, mientras que para los reactores batch y PFR, el factor de efectividad cambia tanto con el tiempo como con la posición y depende de la concentración de las especies químicas. Se puede obtener un factor de efectividad promedio ponderado para la operación del reactor, tomando en cuenta a la concentración de substrato como factor de ponderación:

$$\langle \eta \rangle = \frac{xS_0 - K_M \ln(1 - x)}{\int_{S_0}^S \frac{dS}{\eta S / (K_M + S)}} \text{ --- (4.24)}$$

En el caso de reactores tubulares la dispersión axial es importante. Se considera que los gradientes de concentración en dirección radial son nulos. Esta suposición es más válida mientras el flujo se aproxime más al flujo turbulento plenamente desarrollado, es decir a altos números de Reynolds. La ecuación diferencial gobernante es la de reacción-difusión-convección:

4.2.1 Solución de la ecuación reacción-difusión-convección mediante análisis matemático

Para elegir el método numérico más adecuado, y en ausencia de datos experimentales contra los cuales comparar las predicciones numéricas, se procede a desarrollar la solución analítica (exacta) para la ecuación de reacción-difusión-convección.

En 1997 Zheng y Guo presentaron una solución analítica, basada en transformada de Laplace, para la dinámica en régimen transitorio de un reactor de lecho fluidizado en el que se lleva a cabo una reacción química de primer orden. La ecuación diferencial que gobierna dicho proceso es la siguiente:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} - \frac{1-\epsilon}{\epsilon} kC \quad (4.25)$$

Donde ϵ : es la porosidad del lecho fluidizado. El último término puede escribirse como una sola constante multiplicando a la concentración del reactivo, ya que el cociente $(1 - \epsilon)/\epsilon$, es una constante empírica.

Como ejemplo para este apartado, se considera un caso integrable, el de una reacción química de primer orden., Sin embargo, no se sigue el método de transformada de Laplace utilizado por Zheng y Guo, sino que en lugar de ello se desarrolla una serie de Fourier. El tratamiento analítico que se desarrolla aquí puede servir para biorreactores PFR enzimáticos, pues a pesar de que el modelo de Michaelis-Menten es no lineal:

$$r_Q = \frac{K C_E}{K_M + C_S} C_S \quad (4.26)$$

Si la concentración de substrato se mantiene en valores más altos que la constante de Michaelis, se obtiene una cinética de orden cero. En contraparte, cuando la concentración de sustrato es menor a la constante de Michaelis, se obtiene una cinética de primer orden, pues la suma $K_M + C_S$ en el denominador es casi igual a K_M , quedando una cinética de primer orden:

$$r_Q = K_2 C_S \quad (4.27)$$

Para la solución mediante análisis matemático se procede de la siguiente manera:

Suponiendo que la especie es un reactivo, La ecuación diferencial para el caso unidimensional es:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial x} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - kC \quad (4.28)$$

En primer lugar, se propone el siguiente cambio de variable:

$$C = ue^{-ax} \text{ --- (4.29)}$$

Por lo tanto, las derivadas en espacio y tiempo son

$$C_t = u_t e^{-ax} \text{ --- (4.30)}$$

$$C_x = u_x e^{-ax} - aue^{-ax} \text{ --- (4.31)}$$

$$C_{xx} = u_{xx} e^{-ax} - 2au_x e^{-ax} + a^2 u e^{-ax} \text{ --- (4.32)}$$

Substituyendo estas derivadas en la ecuación de reacción-difusión-convección se obtiene:

$$u_t = Du_{xx} + u_x(-v - 2aD) + u(a^2D + av - k) \text{ --- (4.33)}$$

En segundo lugar, se supone que el término que multiplica a la primera derivada de u con respecto a x es cero, consecuentemente:

$$a = \frac{-v}{2D} \text{ --- (4.34)}$$

Además, como el término que multiplica a u es una suma de puros parámetros, se le denotará a dicha suma como γ , para simplificar notación. Por lo tanto, la ecuación diferencial para u puede escribirse como:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \gamma u \text{ --- (4.35)}$$

Como tercer paso, se lleva a cabo la substitución de la función bidependiente $u(x,t)$ por el producto de dos funciones unidependientes: $u(x, t) = X(x) \Theta(t)$.

Al derivar la ecuación diferencial anterior, queda:

$$X \frac{\partial \Theta}{\partial t} = D \Theta \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} + \gamma X \Theta \text{ --- (4.36)}$$

Dividiendo entre el producto de X por Θ , se obtiene:

$$\frac{1}{\Theta} \frac{d\Theta}{dt} = D \frac{1}{X} \frac{d^2 X}{dx^2} + \gamma \text{ --- (4.37)}$$

La única forma en que el lado izquierdo de esta ecuación se pueda igualar al lado derecho, es que ambos lados sean iguales a una constante de separación, $-\lambda$; obteniéndose por lo tanto un par de ecuaciones diferenciales ordinarias:

El cuarto paso consiste en resolver el par de ecuaciones diferenciales ordinarias. La primera de ellas, da como resultado una función exponencial decreciente con el tiempo:

$$\frac{1}{\Theta} \frac{d\Theta}{dt} = -\lambda \text{ --- (4.38)}$$

$$\Theta = C_0 e^{-\lambda t} \text{ --- (4.39)}$$

La segunda ecuación diferencial corresponde a un oscilador armónico simple:

$$\frac{d^2 X}{dx^2} + \frac{(\lambda + \gamma)}{D} X = 0 \text{ --- (4.40)}$$

La solución de esta ecuación es:

$$X = c_1 \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) + c_2 \text{sen}\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \text{ --- (4.41)}$$

Como quinto paso se introducen las condiciones de frontera. En este ejemplo se considera una condición de frontera no difusiva en uno de los extremos ($x = 0$) del dominio de la solución de la ecuación diferencial y un valor de $u = 0$ en el otro extremo ($x = L$).

Condición de frontera número 1: $\frac{\partial u}{\partial x} = 0$ en $x = 0$, lo cual implica:

$\frac{\partial X}{\partial x} = 0$ en $x = 0$, pues Theta solo depende del tiempo.

$$\frac{dX}{dx} = 0 = -c_1 \sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} \text{sen}\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) + c_2 \sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \text{ --- (4.42)}$$

Con $x = 0$, se encuentra que $c_2 = 0$, por lo cual la X queda dada solo en términos de la función coseno:

$$X = c_1 \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \text{ --- (4.43)}$$

Segunda condición de frontera: $u = 0$ en $x = L$; esto implica que $X = 0$ en $x = L$:

$$0 = c_1 \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} L\right) \text{ --- (4.44)}$$

Los valores en los que el coseno se hace cero corresponden a la condición:

$$\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} = \frac{2n + 1}{2} \pi \text{ --- (4.45)}$$

Por lo cual, los valores propios (eigenvalores) que puede tomar la constante de separación, λ , son:

$$\lambda = \left(\frac{2n+1}{2}\pi\right)^2 D - \gamma \quad (4.46)$$

Entonces, la función u , queda dada por:

$$u = c_0 e^{-\lambda t} c_1 \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \quad (4.47)$$

Pero como el producto de dos constantes (c_0 y c_1) es una sola constante, se puede escribir:

$$u = c_n e^{-\lambda t} \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \quad (4.48)$$

Sólo queda por evaluar los valores que puede tomar la constante c_n . Para ello se introduce la condición inicial.

Condición inicial:

$$u = u_0 \text{ent} = 0 \quad \forall x$$

Para eliminar las componentes ortogonales de c_n que no forman parte de la solución, se realiza el producto punto de la última ecuación por una función que permita eliminar a dichas componentes ortogonales:

$$\left[u_0 = c_n \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \right] \cdot \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) \quad (4.49)$$

Como el producto punto entre dos funciones se define como:

$$f(x) \cdot g(x) = \int f(x)g(x)dx \quad (4.50)$$

Entonces se tiene:

$$\int u_0 \cos\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) dx = c_n \int \cos^2\left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} x\right) dx \quad (4.51)$$

Al integrar queda:

$$\sqrt{\frac{D}{\lambda + \gamma}} u_0 \left[\text{sen} \left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} \frac{x}{L} \right) \right]_0^L = C_n \frac{1}{2} L \text{ --- (4.52)}$$

Despejando c_n :

$$c_n = \frac{2u_0}{\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}}} \text{sen} \left(\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}} \right) = \frac{2u_0}{\sqrt{\frac{\lambda + \gamma}{D}}} \text{sen} \left(\frac{2n + 1}{2} \pi \right) = \frac{2u_0}{\left(\frac{2n + 1}{2} \pi \right)} (-1)^n \text{ --- (4.53)}$$

Por lo tanto, la solución para la función u es:

$$u = \frac{4u_0}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n + 1} \cos \left(\sqrt{\frac{2n + 1}{2}} \pi \frac{x}{L} \right) e^{-\lambda t} \text{ --- (4.54)}$$

Con:

$$\lambda = \left(\frac{2n + 1}{2} \pi \right)^2 D - \frac{v^2}{4D} + \frac{av^2}{2D} + k \text{ --- (4.55)}$$

Una vez habiendo obtenido esta solución analítica (exacta) se procedió a formular un algoritmo de computo en matlab para el despliegado grafico de la evolución espacio temporal de la concentración de la sustancia reaccionante, tal como se muestra a continuación.

Esta solución analítica se compara frente a dos métodos numéricos, el de diferencias finitas y el de retículas de Boltzmann.

4.2.2 Método de diferencias finitas para la solución de la ecuación de reacción-difusión-convección

Este método está basado en el teorema de L'Hopital que corresponde a la definición de la derivada en términos de los límites de una función. La formulación en diferencias finitas de la ecuación de reacción-difusión-convección, tomando en cuenta primera derivada espacial atrasada y paso de tiempo hacia delante, es la siguiente:

$$\frac{C_i^{t+\Delta t} - C_i^t}{\Delta t} = D \frac{C_{i+1}^t - 2C_i^t + C_{i-1}^t}{(\Delta x)^2} - v \frac{C_i^t - C_{i-1}^t}{\Delta x} - kC_i^t \text{ --- (4.56)}$$

En el esquema explícito se despeja $C_i^{t+\Delta t}$, recorriendo todo el dominio de la ecuación diferencial, desde $i = 1$ hasta $i = n$, y resolviendo las ecuaciones resultantes nodo por

nodo. En el esquema implícito, se formulan todas las ecuaciones para todos los nodos y se resuelven simultáneamente. En el caso de cinética química de primer orden u orden cero, se obtienen ecuaciones simultaneas lineales que pueden resolverse mediante eliminación gaussiana o inversión matricial. En el caso de cinéticas de orden fraccionario, o de orden mayor que uno, o cinéticas tipo Michaelis-Menten o Monod, se obtienen sistemas de ecuaciones simultáneas no lineales que pueden ser resueltas mediante el método de Newton o el método iterativo de Gauss-Seidel. En este trabajo solo se consideran diferencias finitas explícitas, debido a que el método de retículas de Boltzmann es de naturaleza explícita.

4.2.3 Método de retículas de Boltzmann para la ecuación de reacción-difusión-convección:

Aparte de los métodos numéricos tradicionales de diferencias finitas, elementos finitos, elementos espectrales, etcétera, una nueva aproximación, basada en la teoría cinético molecular, ha ido ganando popularidad entre la comunidad científica, debido a que se trata de un método explícito que posee gran exactitud, requiere poco tiempo de cómputo y es relativamente fácil de programar, se trata de los autómatas celulares en retículas de Boltzmann. A pesar de que este método fue especialmente formulado para resolver problemas de hidrodinámica compleja, se empleará aquí para resolver la ecuación de reacción-difusión-convección.

Este método se basa en la discretización del dominio de la ecuación diferencial en una serie de nodos uniformemente espaciados, donde se distribuyen varias partículas, cada una de las cuales poseen una velocidad unitaria \mathbf{c} , con magnitud y dirección previamente seleccionada.

Por ejemplo, en la siguiente figura se representa esquemáticamente la distribución inicial del número de partículas, semejante a una distribución Gaussiana. Igualmente se distribuye la velocidad. Obsérvese que en el caso ilustrado sólo se toman en cuenta dos direcciones de movimiento, se trata del modelo D1Q2, que significa una dimensión en el espacio y dos direcciones de movimiento para el autómata.

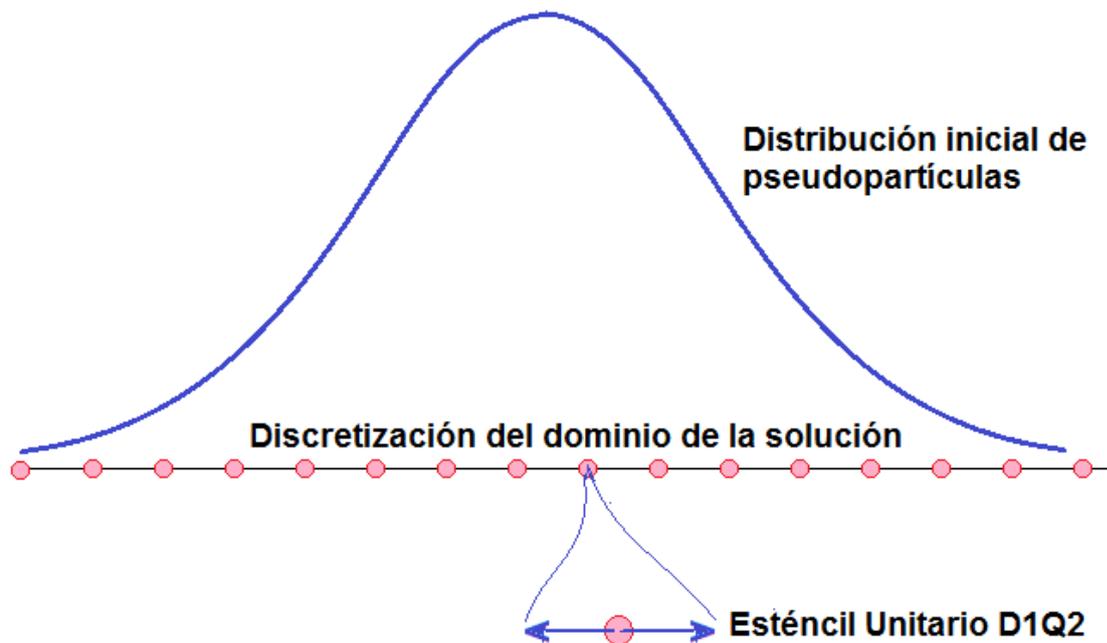


Figura 4.7 Discretización del espacio unidimensional y estencil unitario para los autómatas celulares en redes de Boltzmann.

La distribución inicial no es factor para la rapidez de convergencia del método a la solución exacta, en el caso de que no se evalúe la hidrodinámica del fluido reaccionante. Si se evalúa un perfil de velocidades, la distribución inicial si es factor. En el caso de dinámica de fluidos, mientras más se parezca la distribución inicial a la solución de la ecuación diferencial gobernante (ecuación de Navier-Stokes), más rápidamente se converge a la solución. En problemas de difusión, difusión-convección y difusión-convección con reacción química, la convergencia a la solución exacta de la ecuación diferencial gobernante es directa, no es necesario hacer iteraciones.

El segundo paso en el método es simular el movimiento de las pseudopartículas, paso al que se le conoce como fluidización. Cada partícula avanza a los nodos primeros vecinos, el de la izquierda o el de la derecha, dependiendo del valor de su velocidad.

El tercer paso es la colisión. Al avanzar las pseudopartículas a los nodos vecinos, colisionan con las pseudopartículas que ya se encontraban ahí. La colisión que tiene lugar se lleva a cabo respetando los principios de conservación de masa, momentum y energía.

El resultado, de acuerdo al teorema H de Boltzmann, es una nueva distribución que tiende al equilibrio, sin llegar a él, pero reproduciendo luego de un escalamiento a escalas múltiples el comportamiento macroscópico de los fenómenos de transporte que gobiernan la dinámica del sistema. Matemáticamente el escalamiento se lleva a cabo mediante lo que se conoce como expansión de Chapman-Enskog. Es decir, el método de redes de Boltzmann basa su éxito en su profundo fundamento físico.

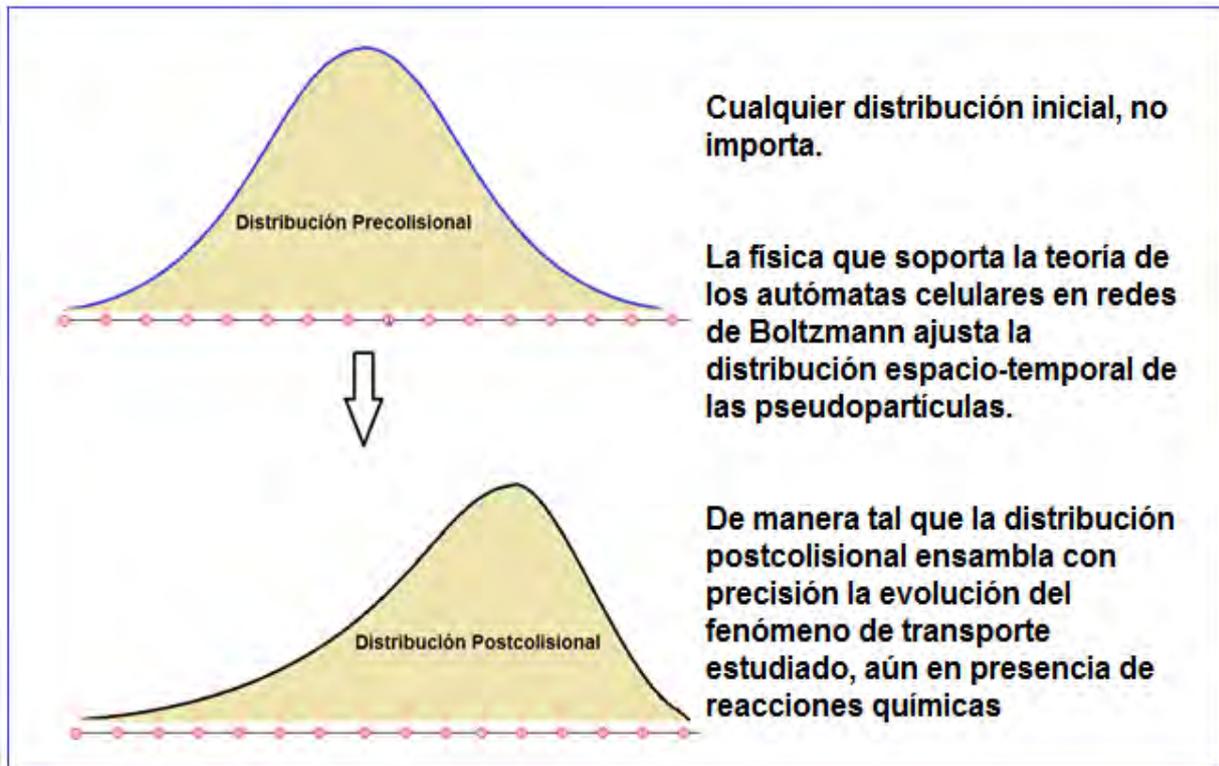


Figura 4.8 Distribuciones Precolisional y Postcolisional del número de partículas en los autómatas celulares de redes de Boltzmann.

La formulación de la ecuación discreta de Boltzmann para el fenómeno de difusión-convección es:

$$f_i(x + \Delta x, t + \Delta t) = f_i(x, t) (1 - \omega) + \omega f_i^{eq}(x, t) \quad \text{----- (4.57)}$$

Donde $f_i(x + \Delta x, t + \Delta t)$ es la función de distribución postcolisional; $f_i(x, t)$ es la función de distribución precolisional, ω , es la frecuencia de colisión (igual al recíproco del tiempo de relajación, $\Delta t / \tau$). Cuando hay reacción química, a la ecuación anterior se le añade el término cinético multiplicado por Δt y dividido entre el número de direcciones de velocidad (esto fue propuesto por He y Li en 1991 y comprobada su exactitud frente a datos experimentales). La frecuencia de las colisiones contiene al parámetro de transporte, en este caso al coeficiente de difusión molecular D está dado por:

$$D = \frac{(\Delta x)^2}{\Delta t \text{ dimensionalidad}} \left(\frac{1}{\omega} - \frac{1}{2} \right) \text{----- (4.58)}$$

Esta ecuación (4.70) sería la misma si se tratase de un fenómeno exclusivo de difusión. La única diferencia estaría en la función de distribución al equilibrio $f_{\alpha}^{eq}(x, t)$, donde para el problema que corresponde a este trabajo, se introduce un término adicional, $\frac{c_i \cdot \mathbf{u}}{c_s^2}$ para incluir el efecto convectivo:

$$f_i^{eq}(x, t) = w_i \phi(x, t) \left[1 + \frac{\mathbf{c}_i \cdot \mathbf{u}}{c_s^2} \right] \text{----- (4.59)}$$

Siendo \mathbf{u} la velocidad de la corriente convectiva de fluido que arrastra consigo a la entidad física $\phi(x, t)$, la concentración de la especie química; mientras que c_i es el vector unitario a lo largo de las direcciones de fluidización del autómata celular. El cuadrado de la velocidad del sonido, c_s^2 , es el cuadrado de la velocidad del autómata en la red; los factores de ponderación w_i , para movimiento hacia adelante y hacia atrás son iguales a $\frac{1}{2}$ para el modelo D1Q2, que es el que se utiliza en este trabajo.

4.2.4 Comparación entre la solución analítica y las soluciones numéricas para un reactor enzimático tubular

El siguiente algoritmo computacional permite graficar la solución analítica (exacta) y compararla frente a las dos soluciones numéricas aquí formuladas.

```
function rdlbmdifinanalit
clearall; close all;clc;
%parámetros para la solución analítica
u0=.1;L=1;D=.001;v=-.01;a=-v/2/D;k=.1; gama=D*a^2+v*a-k;
nit=200;dt=.01;%núm de intervalos de tiempo y paso de tiempo
nx=101;%núm de nodos
%funciones de distribución para el autómata celular
f1(1:nx)=0;%función de distribución para partículas que se mueven hacia adelante
f2(1:nx)=0;%función de distribución para partículas que se mueven hacia atrás
rho(1:nx)=0;%densidad de partículas (concentración)
x(1:nx)=0;dx=L/(nx-1);%matriz de coordenadas nodales (x) y distancia entre nodos
ck=dx/dt;csq=ck*ck;%ck es la velocidad unitaria del autómata en la red
alfa=.002;%coeficiente de difusión
omega=1/(alfa/(dt*csq)+0.5);%frecuencia de colisiones
C(1:nx)=0;%Matriz de concentración
c(nx)=0;%condición de frontera de la alimentación
```

```

error(1:nx)=0;errorlbn(1:nx)=0;%funciones para evaluar el error de dif fin y red Boltz
for i=1:nx %gráfica de la condición inicial
x(i)=(i-1)*dx; % especificación de coordenadas nodales
C(i)=u0*exp(-a*x(i));c(i)=u0*exp(-a*x(i)); %cálculo concentraciones iniciales
end
for i=1:nx%distribución inicial exponencial decreciente
rho(i)=u0*exp(-a*x(i));%concentración exponencial decreciente
f1(i)=0.5*rho(i);%en cada nodo, mitad de las partículas se mueven hacia adelante
f2(i)=0.5*rho(i);%en cada nodo, mitad de las partículas se mueven hacia atrás
end
figure (1)
plot (x,C,'r');hold on; %gráfica condición inicial solución analítica
plot (x,c,'-');hold on; %gráfica condición inicial diferencias finitas
plot (x,rho,'-g'); %gráfica condición inicial red de Boltzmann
for t=1:nit
time=dt*t;
%cálculos por diferencias finitas
for i=2:nx-1
dcdx=(c(i)-c(i-1))/dx;
lap=(c(i+1)-2*c(i)+c(i-1))/dx^2;
c(i)=c(i)+dt*(D*lap-v*dcdx-k*c(i));
end
%condiciones de frontera
c(1)=c(2);%no difusión en extremo izquierdo
c(nx)=0;%concentración igual a cero en extremo derecho
%desplegado gráfico diferencias finitas
figure (2);plot(x,c,'-');hold on;
title(['tiempo=' num2str(time),'segs']);grid on; pause (.1)
%solución analítica vía series de Fourier
for i=1:nx
sum1=0;
for n=0:70
primfact=(-1)^n/(2*n+1);
lambda=((2*n+1)/2*pi/L)^2*D-gama;
raizcuad=((lambda+gama)/D)^.5;
segfact=cos(raizcuad*x(i));
tercfact=exp(-lambda*time)*exp(-a*x(i));
sum1=sum1+primfact*segfact*tercfact;
end
C(i)=4*u0/pi*sum1;
end
%desplegado gráfico solución analítica
figure (2); plot (x,C,'-r');hold on; pause (.1);
%evaluación de error diferencias finitas
sumerror=0;promedioerror=0;
for i=1:nx
error(i)=(C(i)-c(i))/(C(i));
sumerror=sumerror+error(i);
promedioerror=sumerror/nx;
end

```

```

figure (3); plot(t,promedioerror,'.');hold on;
for i=1:nx%Cálculos mediante red de Boltzmann
    %proceso de colisión
    rho(i)=f1(i)+f2(i);rq=-k*rho(i);
    feq1=0.5*rho(i)*(1+v/ck);
    feq2=0.5*rho(i)*(1-v/ck);
    f1(i)=(1-omega)*f1(i)+omega*feq1+dt*rq/2;
    f2(i)=(1-omega)*f2(i)+omega*feq2+dt*rq/2;
end
%fluidización
f1(nx-(2:nx-1)+1)=f1(nx-(2:nx-1));
f2(2:nx-1)=f2((2:nx-1)+1);
f1(nx)=0;f2(nx)=0;
f1(1)=f1(2);
%evaluación de error red de Boltzmann
sumerrorlbm=0;promedioerrorlbm=0;
for i=1:nx
    errorlbm(i)=(C(i)-f1(i)-f2(i))/(C(i));
    sumerrorlbm=sumerrorlbm+errorlbm(i);
    promedioerrorlbm=sumerrorlbm/nx;
end
figure (3); plot(t,promedioerrorlbm,'.r');hold on; contar = t/5;
if ((contar-ceil(contar))==0)
    figure (2); plot (x,f1+f2,'-g');hold off;
else
end
end
end

```

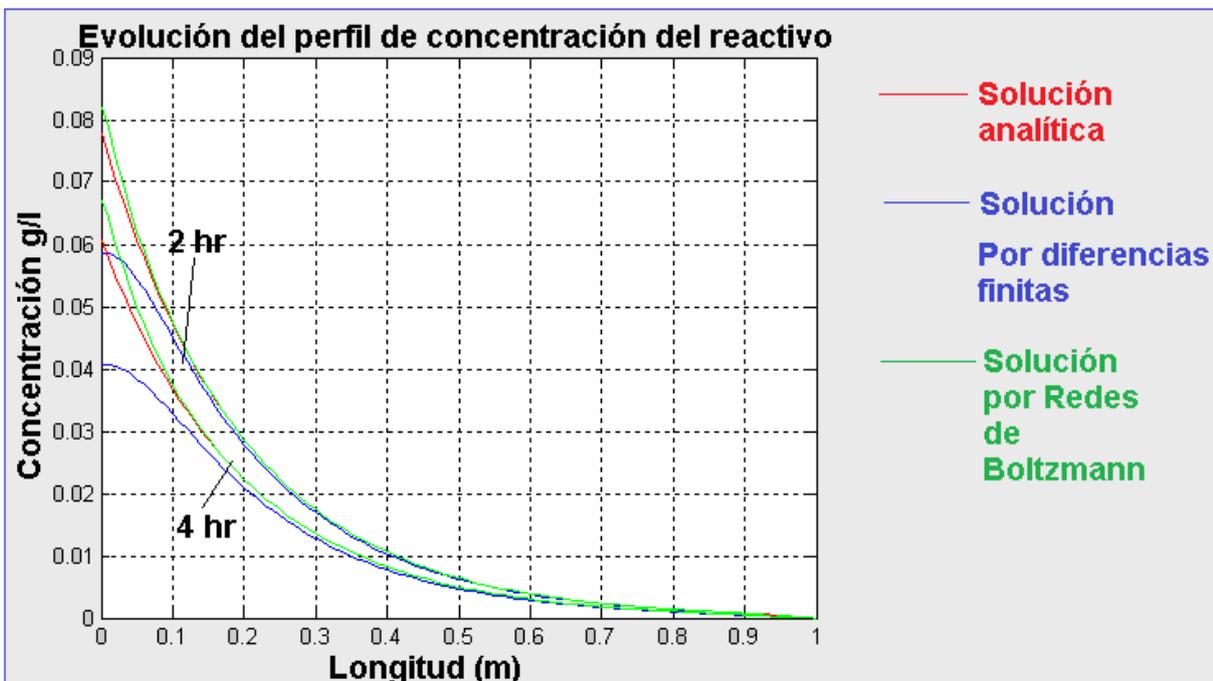


Figura 4.9 Comparación entre la solución analítica y dos aproximaciones numéricas para la ecuación de reacción-difusión-convección en coordenadas cartesianas

Puede observarse que la aproximación por diferencias finitas exhibe un alto margen de error, mientras que el método de redes de Boltzmann muestra una alta exactitud con respecto a la solución analítica.

4.3. Reactor de lecho fijo con enzima inmovilizada en una matriz sólida esférica.

4.3.1 Soluciones analíticas.

Varias enzimas industrialmente importantes se inmovilizan dentro de una matriz sólida para su utilización. Los pellets o pastillas obtenidas, pueden ser recuperadas y reutilizadas después de cada proceso batch o retenidas formando un lecho fijo dentro de un reactor de flujo continuo. La cinética enzimática no es la misma que cuando el biocatalizador se encuentra en forma libre, disuelto o suspendido^[6]; pues, una vez que la enzima ha sido inmovilizada, muchos de los parámetros operacionales son modificados. Esto es debido a que las expresiones cinéticas reportadas en la literatura son correlaciones empíricas correspondientes a ajustes funcionales de datos experimentales. A menudo la rapidez de reacción es menor que en un reactor batch, pero la estabilidad de la enzima es más alta.

Ejemplos de procesos en que se utilizan enzimas inmovilizadas son:

- La conversión de glucosa en fructosa mediante la enzima glucosa-isomerasa, utilizando suero de glucosa como sustrato.
- La producción de penicilina sintética, donde se utiliza la enzima penicilín-deacilasa.
- Enzimas detergentes que son inmovilizadas dentro de matrices sólidas junto con otras sustancias químicas, dando lugar a productos libres de polvo que no producen efectos alérgicos, además de poseer una larga vida de anaquel debido a que los componentes químicos inestables están protegidos contra la humedad. La matriz sólida se disuelve rápidamente en el medio de lavado cuando se utiliza el detergente.

Cuando la enzima se encuentra distribuida en los poros de las pastillas, los sustratos tienen que ser transportados no solamente desde el seno de la solución hacia la

superficie de los pellets, sino también hacia el interior de los poros. Similarmente los productos deben abandonar el interior de los pellets. Comúnmente el transporte por convección es insignificante dentro del medio microporoso del interior del pellet, predominando la difusión molecular.

La siguiente figura es una representación esquemática de los procesos que se llevan a cabo alrededor y en el interior de los pellets que contienen en su interior a la enzima inmovilizada. El sustrato es transportado por convección; la corriente de fluido que fluye con velocidad \vec{v} , acarrea moléculas de sustrato, el término que representa al transporte convectivo de sustrato es $-\vec{v} \cdot \nabla C$. Luego, cuando el sustrato entra en contacto con la superficie de los pellets es adsorbido. Dicha adsorción puede ocurrir en la superficie externa o en el interior de los poros. Dentro de los poros el mecanismo de transporte predominante es la difusión molecular. El sustrato es transportado por difusión Fickiana, el término que representa dicho transporte es $D_S \nabla^2 C$. Una vez que las moléculas de sustrato llegan a los sitios activos de las enzimas, se lleva a cabo la reacción química (r_Q). El producto formado se desorbe de la superficie de los poros y se contradifunde, dicha contradifusión se realiza con velocidad $-D_P \nabla C$. Finalmente, el producto es arrastrado por la corriente de fluido mediante convección.

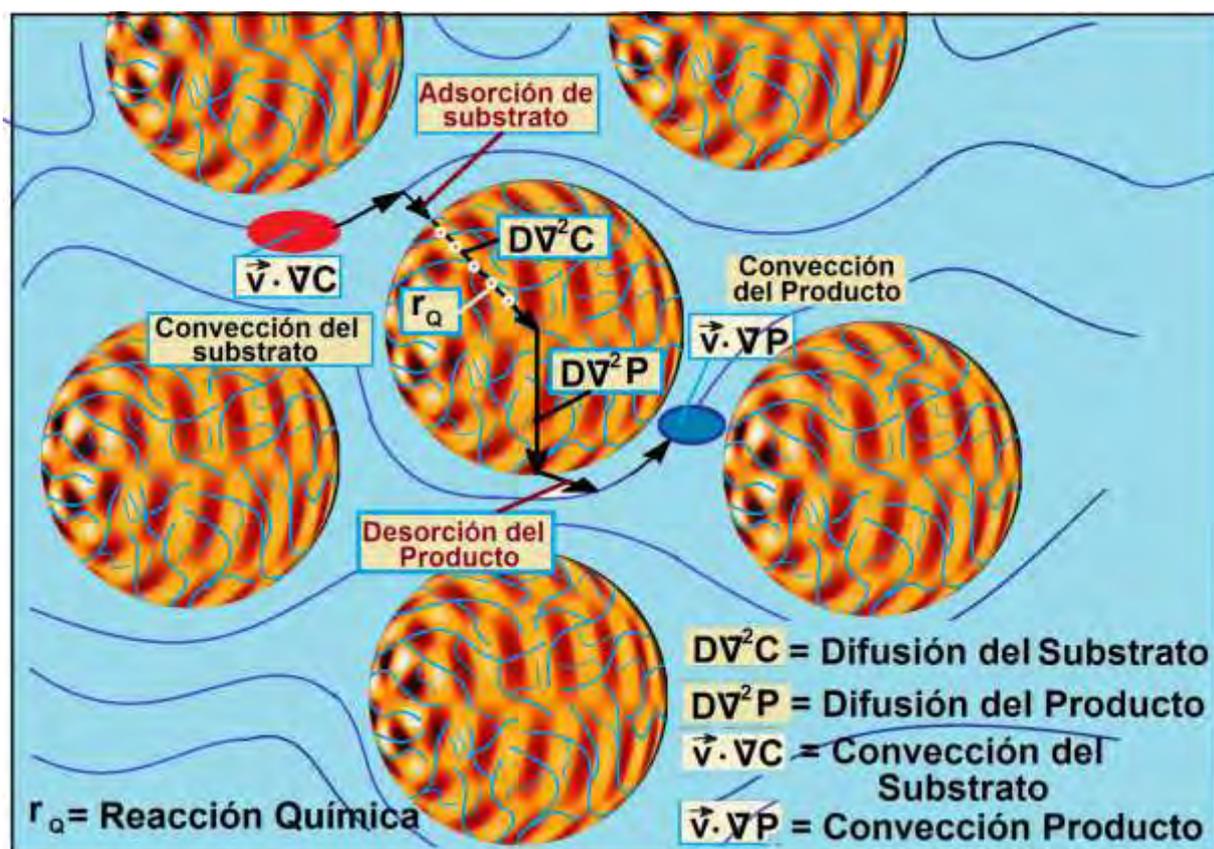


Figura 4.10 Biorreactor de lecho empacado con enzima inmovilizada en el interior de pellets esféricos, con mecanismos de transporte y reacción que ocurren en su interior.

El modelo matemático, para un pellet en el que se lleva a cabo una reacción química, es la ecuación de difusión con reacción química:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \nabla^2 C + r_Q \quad \text{--- (4.60)}$$

Donde el coeficiente de difusión efectivo, D_{ef} toma en cuenta la difusión Fickiana, la porosidad (ε) y la tortuosidad (τ) del lecho fijo. Ésta última variable corresponde a la trayectoria de difusión más larga dentro del lecho empacado: $D_{ef} = D \frac{\varepsilon}{\tau}$

Por ejemplo, $D = 6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, para la difusión de glucosa en una solución típica de 50 gramos de glucosa por litro; ε está en el intervalo de .02 a .05 m^3/m^3 de pellet; y τ tiene valores entre 2 y 3. Por lo tanto D_{ef} es unas diez veces menor que D .

A continuación, se procede a obtener la solución analítica para el fenómeno de reacción-difusión llevándose a cabo dentro de un pellet esférico de enzima inmovilizada, bajo condiciones de estado estacionario.

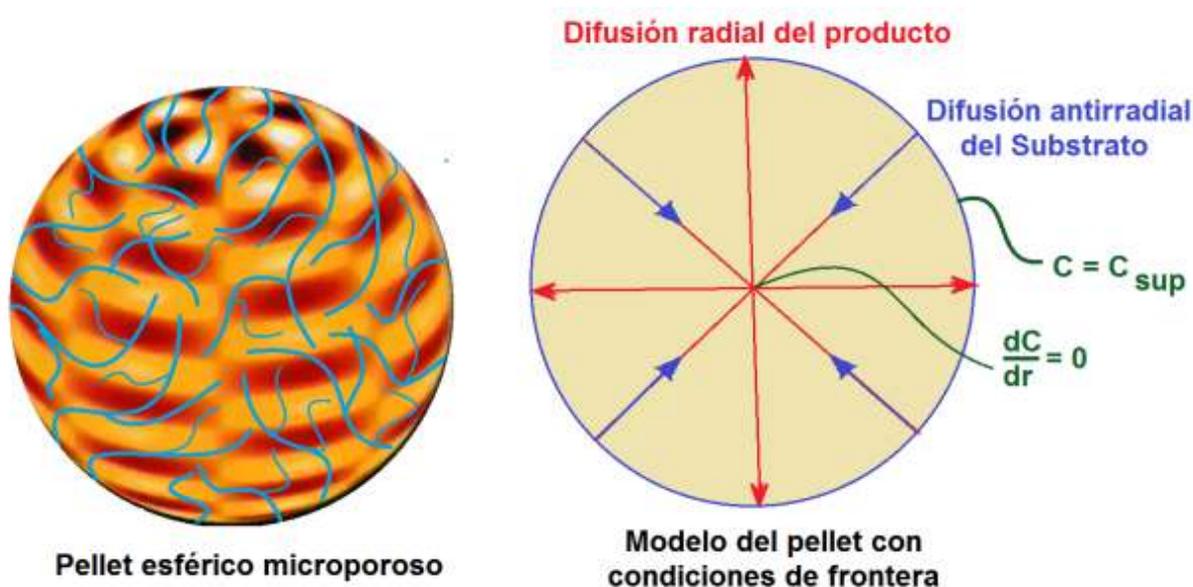


Figura 4.11 Representación esquemática de un pellet esférico y sistemas de coordenadas a emplear, junto con las condiciones de frontera

4.3.1.1 Cinética de orden cero:

La ecuación de reacción-difusión en coordenadas esféricas, escrita para el substrato, considerando cinética de orden cero, es:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) - k_0 \text{ --- (4.61)}$$

En condiciones de estado estacionario:

$$D_{ef} \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) = k_0 \text{ --- (4.62)}$$

Introduciendo las siguientes variables adimensionales:

$$C^* = C/C_{sup}; \quad x = r/R;$$

La ecuación queda como:

$$D_{ef} \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) = k_0 \text{ --- (4.63)}$$

$$\frac{D_{ef} C_{sup}}{R^2 x^2} \frac{d}{dx} \left(x^2 \frac{dC^*}{dx} \right) = k_0 \text{ --- (4.64)}$$

$$\frac{d}{dx} \left(x^2 \frac{dC^*}{dx} \right) = \frac{k_0 R^2}{D_{ef} C_{sup}} x^2 = \Phi_0^2 x^2 \text{ --- (4.65)}$$

En esta última ecuación se ha substituido el módulo de Thiele para reacción de orden cero, Φ_0 . Dicho grupo adimensional representa la competencia entre el consumo de substrato por reacción química y la rapidez con la que entra dicha substancia al interior del pellet por difusión.

Separando variables e integrando:

$$x^2 \frac{dC^*}{dx} = \Phi_0^2 \frac{x^3}{3} + c_1 \text{ --- (4.66)}$$

La primera condición de frontera corresponde a simetría esférica en el centro del pellet:

$$dC^*/dx = 0 \text{ en } x = 0$$

consecuentemente $c_1 = 0$.

Entonces:

$$\frac{dC^*}{dx} = \Phi_0^2 \frac{x}{3} \text{ --- (4.67)}$$

Integrando nuevamente:

$$C^* = \Phi_0^2 \frac{x^2}{6} + c_2 \text{ --- (4.68)}$$

La segunda condición de frontera es $C=C_{sup}$ en $r=R$, es decir:

$C^* = 1$ en $x = 1$

$$c_2 = 1 - \frac{\Phi_0^2}{6} \text{ --- (4.69)}$$

Finalmente, el perfil radial estacionario de la concentración de sustrato queda dado por:

$$C^* = \Phi_0^2 \frac{x^2}{6} + 1 - \frac{\Phi_0^2}{6} \text{ --- (4.70)}$$

A continuación, se presenta un algoritmo de cómputo formulado en Matlab para la representación gráfica de la concentración adimensional de sustrato y producto en el interior del pellet esférico para diferentes valores del número de Thiele.

```
function enzimaesfinmov
clear all; close all; clc;
x(1:21)=0;c(1:21)=0;fi(1:10)=0;
for i=1:21
    x(i)=(i-1)*0.05;
end
for j=1:10
    fi(j)=j*0.2;
for i=1:21
    c(i)=fi(j)^2*x(i)^2/6+1-fi(j)^2/6;
end
plot (x,c,'.-');
hold on;
end
grid on;
```

Los resultados de la ejecución se muestran en la siguiente figura:

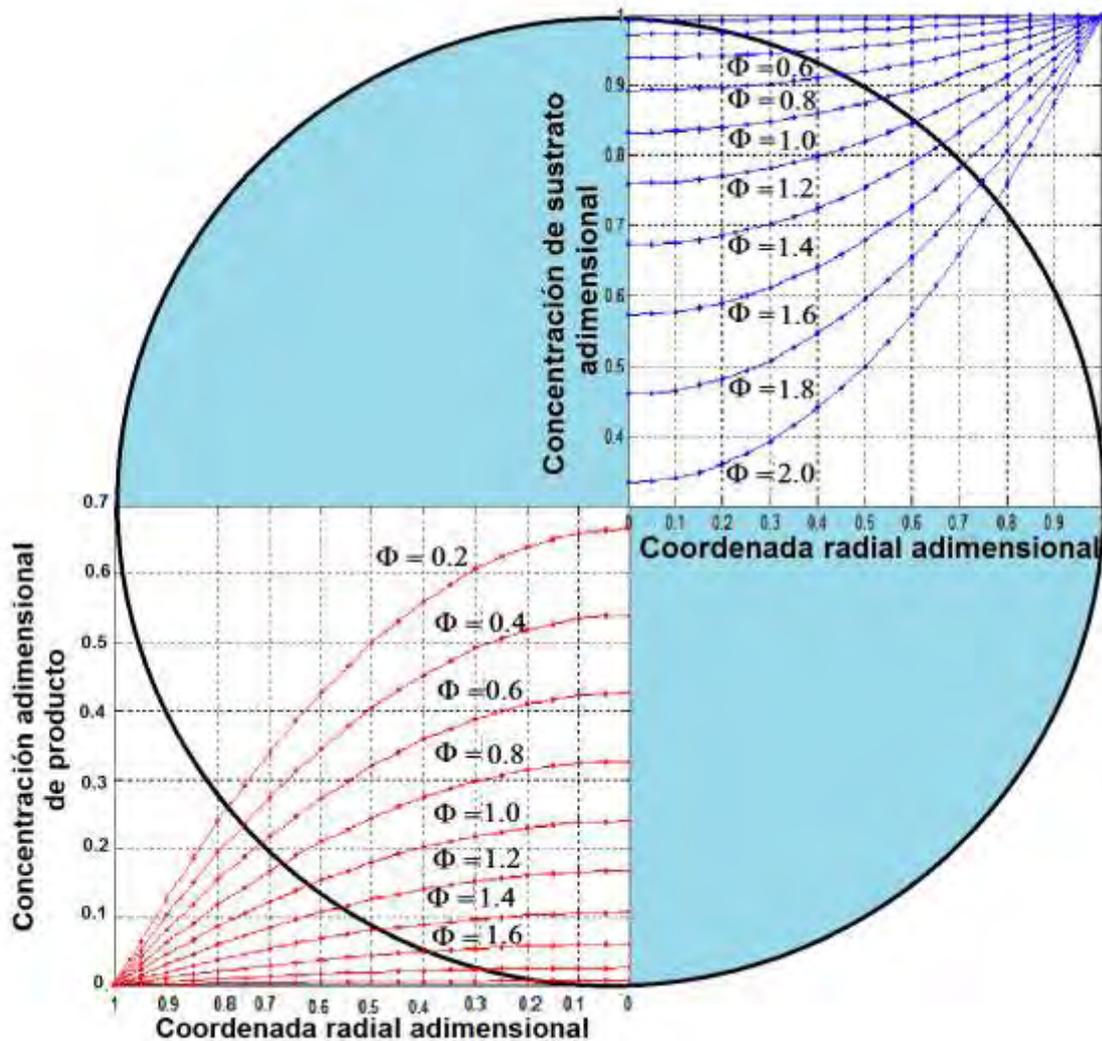


Figura 4.12. Representación Gráfica de la concentración adimensional de sustrato y de producto en función de la coordenada radial adimensional, dentro de un pellet esférico, a diferentes valores del modulo de Thiele para una reacción de orden cero.

4.3.1.2 Cinética de primer orden:

Para cinética de orden uno, la ecuación de reacción-difusión en estado estacionario para coordenadas esféricas es:

$$D_{ef} \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) = k_1 C \quad (4.71)$$

Adimensionalizando:

$$\frac{D_{ef} C_{sup}}{R^2 x^2} \frac{d}{dx} \left(x^2 \frac{dC^*}{dx} \right) = k_1 C^* C_{sup} \quad \text{--- (4.72)}$$

$$\frac{d}{dx} \left(x^2 \frac{dC^*}{dx} \right) = \frac{k_1 R^2}{D_{ef}} x^2 C^* = \Phi_1^2 x^2 C^* \quad \text{--- (4.73)}$$

Ahora el módulo de Thiele, Φ_1 , es para una cinética de primer orden. Esta ecuación se resuelve mediante el siguiente cambio de variable:

$$y = xC^* \quad \text{--- (4.74)}$$

Como:

$$\frac{d^2 y}{dx^2} = \frac{d}{dx} \left(\frac{d}{dx} xC^* \right) = \frac{d}{dx} \left(C^* + x \frac{dC^*}{dx} \right) = 2 \frac{dC^*}{dx} + x \frac{d^2 C^*}{dx^2} \quad \text{--- (4.75)}$$

$$x \frac{d^2 y}{dx^2} = 2x \frac{dC^*}{dx} + x^2 \frac{d^2 C^*}{dx^2} = x \Phi_1^2 x C^* \quad \text{--- (4.76)}$$

Por lo que:

$$\frac{d^2 y}{dx^2} = \Phi_1^2 y \quad \text{--- (4.77)}$$

Esta es una ecuación diferencial ordinaria muy conocida; su solución es:

$$y = C^* x = c_1 \operatorname{senh}(\Phi_1 x) + c_2 \operatorname{cosh}(\Phi_1 x) \quad \text{--- (4.78)}$$

Introduciendo las condiciones de frontera, se obtiene el perfil radial de concentración de substrato:

$$C = C_{sup} \frac{\operatorname{senh}(\Phi_1 r/R)}{(r/R) \operatorname{senh}(\Phi_1)} \quad \text{--- (4.79)}$$

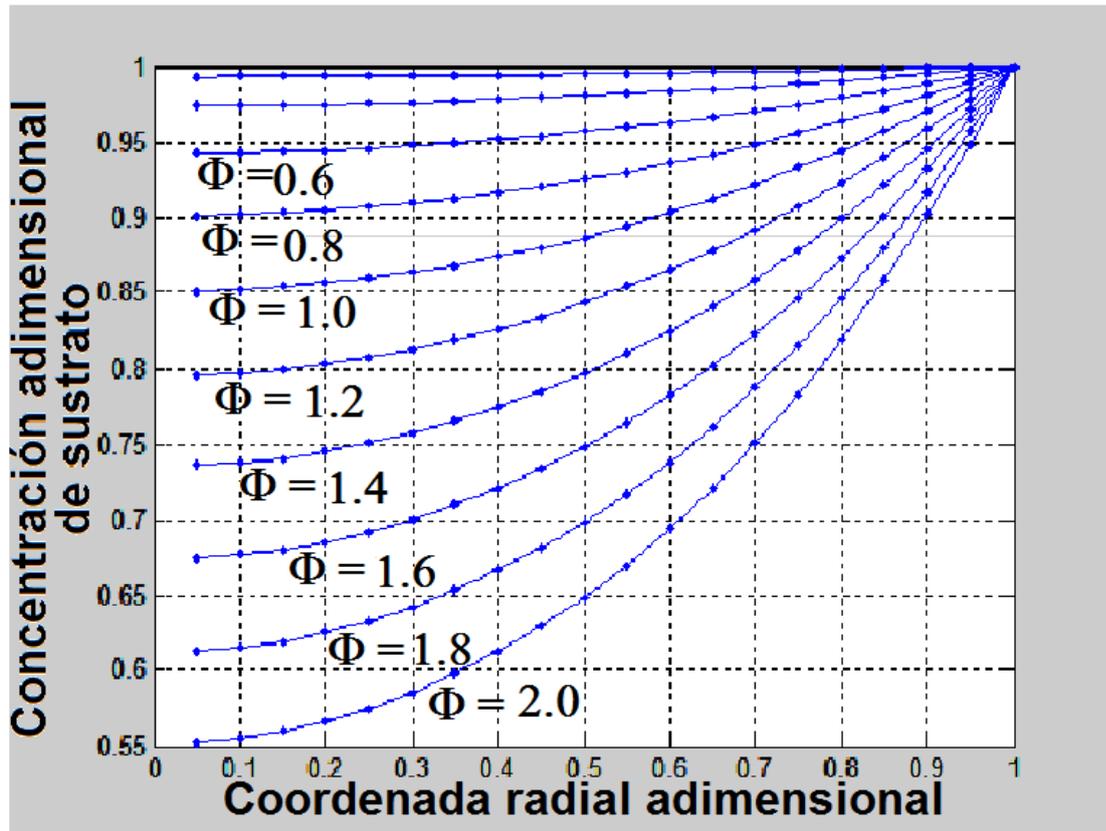


Figura 4.13. Representación Gráfica de la concentración adimensional de sustrato y de producto en función de la coordenada radial adimensional, dentro de un pellet esférico, a diferentes valores del módulo de Thiele para una reacción de primer orden.

4.3.2 Transporte transitorio de masa al interior de una esfera

Antes de formular algoritmos de cómputo para la ecuación de difusión con reacción química en coordenadas esféricas, se realizará un análisis de la exactitud de dos esquemas numéricos explícitos, el de diferencias finitas y el de autómatas celulares en retículas de Boltzmann. Para ello se considera la ecuación de difusión molecular transitoria, obteniéndose primero la solución analítica para tener un parámetro de referencia contra el cual comparar las soluciones numéricas. Dicha ecuación diferencial es:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \alpha \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \right] \quad \text{--- (4.80)}$$

Para empezar, se lleva a cabo el cambio de variable $Y = rT$, lo cual conduce a la ecuación diferencial parcial:

$$\frac{\partial Y}{\partial t} = \alpha \frac{\partial^2 Y}{\partial r^2} \quad \text{--- (4.81)}$$

4.3.2.1 Solución Analítica

Ahora se aplica el método de separación de variables. La función bidependiente $Y(r,t)$ se escribe como el producto de dos funciones unidependientes: $Y(r,t) = P(r) \Theta(t)$. Esto conduce a:

$$P \frac{d\Theta}{dt} = \alpha \Theta \frac{d^2 P}{dr^2} \quad (4.82)$$

Separando variables e introduciendo la constante de separación $-\lambda^2$, se obtiene el siguiente par de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{1}{\alpha \Theta} \frac{d\Theta}{dt} = \frac{1}{P} \frac{d^2 P}{dr^2} = -\lambda^2 \quad (4.83)$$

La solución para Θ es:

$$\Theta = c_1 \exp(-\lambda^2 \alpha t) \quad (4.84)$$

Para la función P se tiene la ecuación de un oscilador armónico simple, cuya solución es:

$$P = c_2 \cos(\lambda r) + c_3 \sen(\lambda r) \quad (4.85)$$

La primera condición de frontera es la simetría radial esférica, por lo que:

$$\frac{\partial C}{\partial r} = 0, \quad \text{y por lo tanto } \frac{dP}{dr} = 0, \quad \text{en } r = 0 \quad \forall t$$

Consecuentemente:

$$\frac{dP}{dr} = 0 = c_2 \cos(0) + c_3 \sen(0) \quad (4.86)$$

$$P = c_3 \sen(\lambda r) \quad (4.87)$$

Como $C = Y/r$, $C(r, t)$ está dada por:

$$C = c_1 \exp(-\lambda^2 \alpha t) \left[\frac{c_3}{r} \sen(\lambda r) \right] \quad (4.88)$$

Introduciendo la condición de frontera, correspondiente a: $C = C_{sup}$ en $r = R$, se obtiene:

$$C - C_{sup} = \exp(-\lambda^2 \alpha t) \left[\frac{c_3}{r} \sen(\lambda r) \right], \quad \text{con } \lambda = n \pi / R \quad (4.89)$$

Luego, aplicando la condición inicial $C = C_0$ en el tiempo $t = 0$, para todo radio r , se obtiene:

$$C - C_{sup} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{c_n}{r} [\sen(\lambda_n r)] \exp(-\alpha \lambda_n^2 t) \quad (4.90)$$

Evaluando c_n , finalmente se obtiene la siguiente serie de Fourier:

$$\frac{C - C_{sup}}{C_{sup} - C_0} = \frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\cos(n\pi)}{n} \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left[-\frac{\alpha n^2 \pi^2 t}{R^2}\right] \quad (4.90)$$

4.3.2.2. Aproximación por diferencias finitas:

Para la discretización de la ecuación diferencial en el esquema de diferencias finitas, se considera un mallado radial unidimensional uniformemente espaciado, con el estencil unitario que se muestra a continuación:

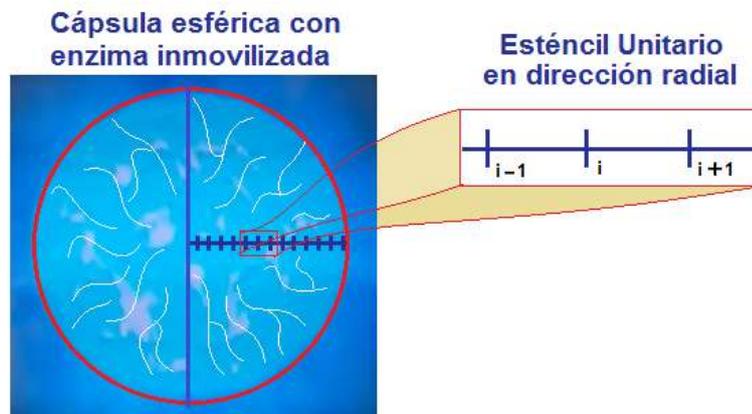


Figura 4.14 Estencil unitario para el método numérico de diferencias finitas aplicado a la difusión molecular en el pellet esférico

La formulación de la ecuación diferencial gobernante en el esquema de diferencias finitas es:

$$\frac{C_i^{t+\Delta t} - C_i^t}{\Delta t} = \alpha \left[\frac{2(C_i^t - C_{i-1}^t)}{r_i \Delta r} + \frac{C_{i+1}^t - 2C_i^t + C_{i-1}^t}{(\Delta r)^2} \right] \quad (4.91)$$

En el esquema de diferencias finitas explícito que se aplica en este análisis, se despeja $C_i^{t+\Delta t}$ en cada paso de tiempo, quedando en términos de las concentraciones de los dos nodos primeros vecinos y de la concentración del mismo nodo en el paso de tiempo anterior.

4.3.2.3 Modelo de autómatas celulares en retículas de Boltzmann

Como puede observarse, la formulación de diferencias finitas tiene un fundamento muy sencillo que consiste en aproximar las derivadas mediante cocientes de incrementos finitos. Otro método, que tiene un fundamento físico muy profundo, basado en colisiones elásticas entre pseudopartículas rígidas, es el de los autómatas celulares en retículas de Boltzmann.

En esta aproximación se hipotetiza que el medio continuo está conformado por partículas imaginarias que se mueven de un punto a otro en el espacio, colisionando

entre ellas. La densidad del número de partículas en cada punto del espacio permite calcular la concentración local.

El origen de este método se remonta a la ecuación de transporte de Boltzmann de 1871, escrita específicamente para describir la dinámica de fluidos:

$$\frac{\partial f}{\partial t} + v \cdot \nabla f + F \cdot \nabla_{\xi} f = \iiint \iiint (I_{postcol} - I_{precol}) dx dy dz dv_x dv_y dv_z = \Omega \quad (4.92)$$

En esta ecuación f es la función de distribución de pseudopartículas, que indica cuántas partículas imaginarias se encuentran en cada punto del espacio y qué velocidad tienen; v es la velocidad macroscópica del fluido, F representa a las fuerzas externas que actúan sobre el fluido; $I_{postcol}$ e I_{precol} son las interacciones postcolisionales y precolisionales, respectivamente, ambas de naturaleza fuertemente no lineal; ∇f es el gradiente Euclideo, mientras que el gradiente cinético $\nabla_{\xi} f = i \frac{\partial}{\partial v_x} + j \frac{\partial}{\partial v_y} + k \frac{\partial}{\partial v_z}$, evalúa los cambios de la función de distribución con la velocidad. Esta ecuación integrodiferencial hexadimensional evalúa los efectos de las colisiones entre partículas imaginarias y las consecuencias que dichas colisiones tienen sobre los transportes macroscópicos de masa, calor y momentum. A Ω se le denomina operador de colisión. La solución analítica de esta ecuación integrodiferencial siempre ha representado un reto. Pero en 1954, Bhatnagar, Gross y Krook, propusieron un operador de colisión linealizado.

En el caso de procesos de difusión unidimensionales, la ecuación de transporte de Boltzmann se simplifica a la siguiente expresión:

$$\frac{\partial f_k}{\partial t} + c_k \frac{\partial f_k}{\partial x} = \Omega_k \quad (4.93)$$

Donde c_k representa la velocidad con la que se mueven las pseudopartículas en cada una de las direcciones del estencil unitario. En el modelo D1Q2, dichas direcciones son la radial (1) y la antirradial (2), como se representa en la siguiente figura:



Figura 4.15 Estencil unitario para el método de retículas de Boltzmann para difusión molecular en coordenadas esféricas.

El lado izquierdo de esta ecuación toma en cuenta el proceso de fluidización durante el cual la función de distribución, f_k , es advectada hacia los sitios primeros vecinos de la malla de la red de Boltzmann, con velocidad $c_k = \Delta x / \Delta t$. Ω_k representa la rapidez de cambio de la función de distribución debido a los procesos de colisión.

En la aproximación BGK (Bhatnagar-Gross-Krook), el operador de colisión se aproxima como:

$$\Omega_k = \frac{-1}{\tau} (f_k - f_k^{eq}) \quad (4.94)$$

Tau (τ) representa al tiempo de relajación hacia la distribución al equilibrio (f_k^{eq}), el cual está relacionado directamente con el coeficiente de difusión molecular a escala macroscópica.

La ecuación cinética puede discretizarse de la siguiente manera:

$$\frac{f_k(x+c_k\Delta t, t+\Delta t) - f_k(x, t)}{\Delta t} = - \frac{f_k(x, t) - f_k^{eq}(x, t)}{\tau} \quad (4.95)$$

Despejando la función de distribución postcolisional:

$$f_k(x + c_k\Delta t, t + \Delta t) = f_k(x, t)(1 - \omega) + \omega f_k^{eq}(x, t) \quad (4.96)$$

Esta es la regla de recurrencia para resolver problemas de difusión molecular unidimensional mediante teoría cinética.

La concentración se calcula a partir de la función de distribución con:

$$C(x, t) = \sum_{k=1}^2 f_k(x, t) \quad (4.97)$$

La función de distribución al equilibrio es:

$$f_k^{eq} = w_k C(x, t) \quad (4.98)$$

Para el autómata D1Q2, los factores de ponderación, con los cuales se evalúa la influencia relativa de cada una de las pseudopartículas sobre las interacciones, en el transcurso de las colisiones, son $w_1 = w_2 = 1/2$. La suma de estos factores de ponderación debe ser igual a 1. Por ejemplo en el modelo D1Q3, hay tres direcciones de movimiento, los movimientos hacia derecha e izquierda tienen factores de ponderación $w_1 = w_2 = 1/6$, mientras que las pseudopartículas que no se mueven, tienen $w_3 = 2/3$.

Finalmente, la relación entre el coeficiente de difusión Fickiano (α) y el tiempo de relajación, puede ser deducida a partir de una expansión a multi-escalas de Chapman-Enskog; el resultado es:

$$\alpha = \frac{(\Delta x)^2}{\text{Dimensionalidad} \Delta t} \left(\tau_D - \frac{1}{2} \right) \quad (4.99)$$

Entonces, luego de establecer una distribución inicial, compatible con las condiciones iniciales, los cálculos inician dándoles movimiento a las pseudopartículas, en lo que se conoce como paso de fluidización (streaming en inglés, aunque algunos profesores Cuautitecas prefieren llamarle “propagación”). Luego se evalúa la función de distribución al equilibrio, y se aplica la regla de recurrencia para el paso de colisión. El resultado es una nueva función de distribución (función de distribución postcolisional) a partir de la cual se calcula el perfil de concentración para el tiempo actual. Estos cálculos se realizan dentro de un ciclo de tiempo, El autómeta celular en red de Boltzmann, da automáticamente la aproximación a la evolución espacio-temporal de la concentración, sin necesidad de cálculos iterativos como cuando se resuelve la ecuación de Navier-Stokes para flujo de fluidos. La siguiente figura representa este algoritmo:



Figura 4.16 Diagrama de flujo para el algoritmo de redes de Boltzmann

En su libro de texto, A. A. Mohamad (“Lattice Boltzmann Method, Wiley, 2011) formula una serie de algoritmos que presenta en su apéndice. Él presenta un código para difusión unidimensional en coordenadas cartesianas y da una recomendación para el tratamiento en coordenadas cilíndricas y esféricas. A pesar de ser un libro excelente, mi asesor y yo creemos que, en el caso de difusión no estacionaria unidimensional en coordenadas cartesianas, hay un problema en la formulación de las condiciones de frontera.

Para la conversión en coordenadas esféricas se introdujo un término fuente, ya que el volumen del material aumenta conforme crece la coordenada radial cuando el paso de longitud radial permanece constante. Dicho término fuente es:

$$\text{término fuente} = \frac{2\alpha}{r} \frac{C_{i+1} - C_{i-1}}{2\Delta r} \quad (4.100)$$

En el algoritmo de cómputo que se formula aquí y cuyo código se presenta a continuación, se presenta una subrutina para los autómatas celulares en redes de Boltzmann, junto con una subrutina para el método de diferencias finitas y otra para la solución analítica. Para la red de Boltzmann, la fluidización de las pseudopartículas en dirección radial se evaluó con una secuencia de cálculos progresiva, mientras que en dirección antirradial se formuló una secuencia retrógrada, como debe ser. Obsérvese la forma en que se especifica la condición de simetría en el nodo central.

function lbmdifsnesf

```

% este programa resuelve numéricamente la ecuación de difusión molecular en
% coordenadas esféricas, mediante los métodos de diferencias finitas y
% retículas de Boltzmann, junto con la solución analítica vía series de
% Fourier. la concentración inicial es de 37; la concentración
% de la superficie es de 90 y se considera simetría esférica dC/dr =0 en
% el centro de la esfera
clear all; close all; clc;
Cinic=37;%concentración inicial en el interior de la esfera
u=0;%velocidad para transporte convectivo. en este caso es cero
m=100;dt=.2;dx=0.075/m;%número de nodos, paso de tiempo y espaciamiento
x(1:m)=0;%dimensionamiento vector coordenadas nodales
for i=1:m;x(i)=(i-1)*dx;end%especificación de coordenadas nodales
ck=dx/dt;%rapidez de propagación de la temperatura en el autómata
rho=1060;alfa=0.512/rho/3600;%densidad y difusividad molar
omega=1/(alfa/(dt*ck^2)+1/2);%frecuencia de colisiones
taud=1/omega;%tiempo de relajación
nit=50000;Csup=90;%concentración superficial invariante
rho(1:m)=2*Cinic;%condiciones iniciales
f1(1:m)=rho(1:m)/2;f2(1:m)=rho(1:m)/2;%dimensionamiento funcs de distrib
Cd(1:m)=Cinic;%conc inicial para método de diferencias finitas
Cd(m)=Csup;%conc superficial invariante para método de dif finitas
Can(1:m)=0;%dimensionamiento vector concentración para sol analítica
r(1:m)=0;%dimensionamiento vector coordenada radial para red de Boltzmann
for i=1:m;r(i)=(i-1)*dx;end%especificacn coord radial para red de Boltzmann
source(1:m)=0;%dimensionamiento término fuente para red de Boltzmann
feq1(1:m)=0;feq2(1:m)=0;%dimensionamiento funcs de distrib al equilibrio
for t=1:nit
%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%
%solución analítica vía series de Fourier
for i=1:m
suma=0;
for n=1:40%número de elementos en la sumatoria de la serie de Fourier
factr1=cos(n*pi)/n*sin(n*pi*r(i)/r(m));
factr2=exp(-alfa*n^2*pi^2*t*dt/r(m)^2);
suma =suma+factr1*factr2;

```

```

end
Can(i)=Csup+2*(Csup-Cinic)/pi*suma*r(m)/r(i);
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Solución numérica por diferencias finitas explícitas
for i=2:m-1
    lap=((Cd(i+1)-2*Cd(i)+Cd(i-1))+1/r(i)*(Cd(i)-Cd(i-1))*dx);
    Cd(i)=Cd(i)+dt*alfa/dx^2*lap;
end
Cd(1)=Cd(2);% centro de simetría
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Solución mediante retículas de Boltzmann %%%%%%%%%
rho(1:m)=f1(1:m)+f2(1:m);
% distribución al equilibrio
feq1(1:m)=1/2*rho(1:m)*(1+u/ck); feq2(1:m)=1/2*rho(1:m)*(1-u/ck);
% cálculo término fuente
for i=2:m-1
    source(i)=2*alfa/r(i)*(rho(i+1)-rho(i-1))/2/dx;
end
% colisión
f1(2:m-1)=(1-omega)*f1(2:m-1)+omega*feq1(2:m-1)+dt*1/2*source(2:m-1);
f2(2:m-1)=(1-omega)*f2(2:m-1)+omega*feq2(2:m-1)+dt*1/2*source(2:m-1);
%fluidización
f1(m-(2:m-1)+1)=f1(m-(2:m-1));
f2(2:m-1)=f2((2:m-1)+1);
%condiciones de frontera
f1(m)=Csup; % en m frontera tipo Dirichlet
f2(m)=Csup; % en m frontera tipo Dirichlet
f1(1)=f2(2);f2(1)=f1(2); %centro simetría
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
contar=t/5000;
if((contar-ceil(contar))==0)
    figure (1)
    plot (x,(f1+f2)/2,'-r');hold on;grid on;
    plot (x,Cd,'-');
%figure (2)
    plot (x, Can,'.k');hold on;
    title(['tiempo=' num2str(t*dt),'segs']);grid on;
else
end
end
end

```

Los resultados de la ejecución de este programa se muestran a continuación.

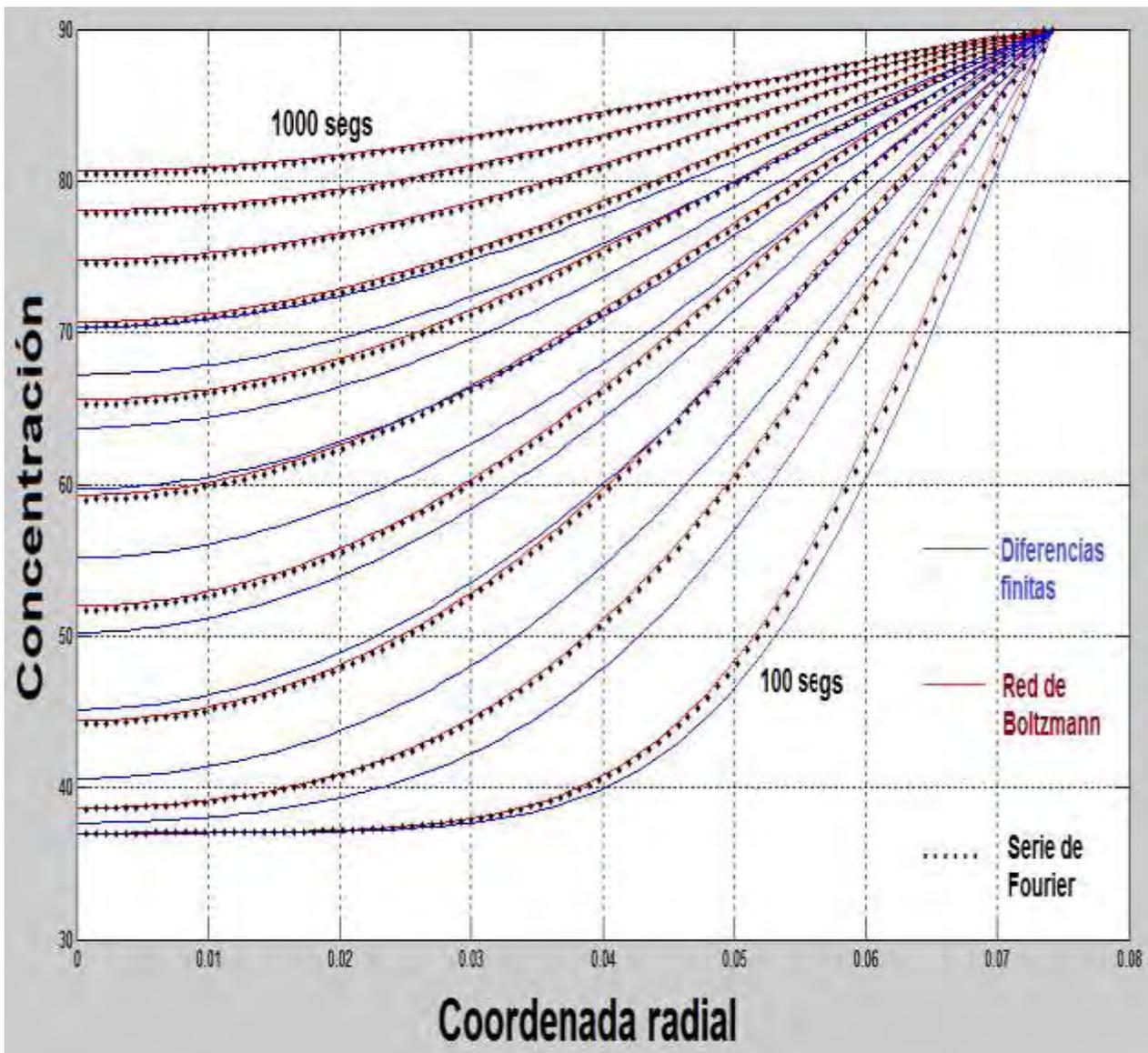


Figura 4.17 Comparación entre la solución analítica (exacta) y las aproximaciones numéricas por diferencias finitas y redes de Boltzmann. Obsérvese la gran exactitud del autómata celular.

Nótese que la solución exacta (puntos en negro) coincide casi perfectamente con la solución de redes de Boltzmann (líneas rojas); la pequeña diferencia puede deberse al número de términos en la serie de Fourier de la solución analítica o al uso de un modelo D1Q2 en lugar de D1Q3 en el autómata celular. Las diferencias finitas exhiben gran error.

4.3.3. Modelo de retículas de Boltzmann para difusión con reacción enzimática

La solución analítica para el proceso de reacción-difusión que se lleva a cabo en el interior de los pellets de enzima inmovilizada es difícil de obtener, debido a las dificultades que representa resolver un proceso de difusión con reacción química no lineal en coordenadas esféricas. Quizá exista en la literatura científica algún reporte de dicha solución, pero no es de nuestro conocimiento. En vista de ello, en este apartado se implementa un método numérico basado en autómatas celulares de retículas de Boltzmann, formulándose una solución para régimen transitorio. La ecuación diferencial gobernante, para cinética de Michaelis-Menten, es:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) - \frac{k_1 C}{K_M + C} \quad (4.101)$$

En su libro de texto "Lattice Boltzmann Method", A. Mohamad formula un algoritmo de cómputo para la ecuación de difusión sin reacción química en coordenadas cartesianas 1D, además de dar una breve recomendación para el tratamiento en coordenadas cilíndricas. En el algoritmo que se presenta aquí se propone la introducción de un término fuente como lo recomienda el mismo Mohamad pero sin entrar en detalle. Otra diferencia es que aquí se consideran coordenadas esféricas. El algoritmo de cómputo es el siguiente la explicación se da junto con el listado.

function lbmpelletesfericop

```
% Este programa simula el proceso de difusión con reacción química en el
% interior de un pellet esférico con enzima inmovilizada, mediante
% diferencias finitas y autómatas celulares en retículas de Boltzmann. Se
% considera una cinética de Michaelis-Menten. Las condiciones de frontera
% son de tipo Dirichlet en la superficie exterior de la esfera y Simetría
% radial en el centro de la esfera. Se consideran pellets de 5 mm de radio
clear all; close all; clc;
m=101;dt=.002;dx=0.005/(m-1);%núm de nodos, paso de tiempo y espaciamento
nit=180000;%número total de intervalos de tiempo
Cinic=37;u=0;%concentración inicial de sustrato en la esfera
ck=dx/dt;%rapidez de movimiento de las pseudopartículas en el autómata
r(1:m)=0;for i=1:m;r(i)=(i-1)*dx;end%especificación coordenadas radiales
k=.87;km =4.2e-3;%coeficiente cinético y constante de Michaelis
alfa=1.34e-7;%coeficiente de difusión
omega=1/(alfa/(dt*ck^2)+1/2);% frecuencia de colisiones
Csup=90;%Concentración invariante en la superficie
%condiciones iniciales para red de Boltzmann
rho(1:m)=2*Cinic;%concentración inicial de sustrato en toda la esfera
f1(1:m)=rho(1:m)/2;%función de distribución radial para el sustrato
f2(1:m)=rho(1:m)/2;%función de distribución antirradial para el sustrato
rhog(1:m)=0;%concentración inicial de producto en toda la esfera
g1(1:m)=rhog(1:m)/2;%función de distribución radial para el producto
g2(1:m)=rhog(1:m)/2;%función de distribución antirradial para el producto
%dimensionamiento de vectores para el cálculo con red de Boltzmann
source(1:m)=0;%término fuente para el sustrato
feq1(1:m)=0;feq2(1:m)=0;%funcns de distribución al equilibrio p/sustrato
```

```

sourceg(1:m)=0;%término fuente para el producto
geq1(1:m)=0;geq2(1:m)=0;%funcns de distribución al equilibrio p/producto
rq(1:m)=0;%vector para reacción química en cada nodo de la red de Boltzmann
%condiciones iniciales para diferencias finitas
Cd(1:m)=Cinic;%concentración inicial del sustrato en toda la esfera
Cp(1:m)=0;%concentración inicial de producto en toda la esfera
%condición de frontera invariante
Cd(m)=Csup;%concentración de sustrato en la superficie de la esfera
Cp(m)=0;%concentración de producto en la superficie de la esfera
for t=1:nit
% * * * * * Inicio Método de Diferencias Finitas * * * * *
for i=2:m-1
    lapd=alfa/dx^2*((Cd(i+1)-2*Cd(i)+Cd(i-1))+1/r(i)*(Cd(i)-Cd(i-1))*dx);
    lapp=alfa/dx^2*((Cp(i+1)-2*Cp(i)+Cp(i-1))+1/r(i)*(Cp(i)-Cp(i-1))*dx);
    Cd(i)=Cd(i)+dt*lapd-k*dt*Cd(i)/(km+Cd(i));
    Cp(i)=Cp(i)+dt*lapp+k*dt*Cd(i)/(km+Cd(i));
end
Cd(1)=Cd(2);% condición de simetría radial para conc de sustrato
Cp(1)=Cp(2);% condición de simetría radial para conc de producto
% * * * * * Fin Método de Diferencias Finitas * * * * *
% * * * * *
% * * * * * Autómata Celular en red de Boltzmann * * * * *
% * * * * *
rho(1:m)=f1(1:m)+f2(1:m);
rhog(1:m)=g1(1:m)+g2(1:m);
%funciones de distribución al equilibrio
feq1(1:m)=1/2*rho(1:m)*(1+u/ck); feq2(1:m)=1/2*rho(1:m)*(1-u/ck);
geq1(1:m)=1/2*rhog(1:m)*(1+u/ck); geq2(1:m)=1/2*rhog(1:m)*(1-u/ck);
%cálculo términos fuente para conversión a coordenadas esféricas
for i=2:m-1
    source(i)=2*alfa/r(i)*(f2(i+1)-f1(i-1))/(1/2+alfa);
    source(i)=2*alfa/r(i)*(g2(i+1)-g1(i-1))/(1/2+alfa);
    rq(i)=k*rho(i)/(km+rho(i));%cinética química
end
% colisión
f1(2:m-1)=(1-omega)*f1(2:m-1)+omega*feq1(2:m-1)+dt*1/2*source(2:m-1)-
k/2*dt*rho(2:m-1)/(km+rho(2:m-1));
f2(2:m-1)=(1-omega)*f2(2:m-1)+omega*feq2(2:m-1)+dt*1/2*source(2:m-1)-
k/2*dt*rho(2:m-1)/(km+rho(2:m-1));
g1(2:m-1)=(1-omega)*g1(2:m-1)+omega*geq1(2:m-1)+dt*1/2*133source(2:m-1)+
k/2*dt*rho(2:m-1)/(km+rho(2:m-1));
g2(2:m-1)=(1-omega)*g2(2:m-1)+omega*geq2(2:m-1)+dt*1/2*133source(2:m-1)+
k/2*dt*rho(2:m-1)/(km+rho(2:m-1));
%fluidización
f1(m-(2:m-1)+1)=f1(m-(2:m-1));%progresiva
f2(2:m-1)=f2((2:m-1)+1);%retrógrada
g1(m-(2:m-1)+1)=g1(m-(2:m-1));%progresiva
g2(2:m-1)=g2((2:m-1)+1);%retrógrada
%condiciones de frontera
f1(m)=Csup;% Dirichlet para f1

```

```

f2(m)=Csup;% Dirichlet para f2
f1(1)=f2(2);f2(1)=f1(2); % en el centro simetría radial
g1(m)=0;% Dirichlet para g1
g2(m)=0;% Dirichlet para g2
g1(1)=g2(2);g2(1)=g1(2); % en el centro simetría radial
rho(1:m)=(f1(1:m)+f2(1:m));rhog(1:m)=(g1(1:m)+g2(1:m));
Ct(1:m)=(rho(1:m)+rhog(1:m))/2;
rho(1:m)=rho(1:m)/Ct(1:m);rhog(1:m)=rhog(1:m)/Ct(1:m);
contar=t/5000; %desplegado gráfico de resultados
if((contar-ceil(contar))==0)
figure (1); plot (r,Cd,'-r');hold on;
plot (r,Cp,'-b');
title(['tiempo=' num2str(t*dt),'mins']);grid on;
figure (2); plot (r,(g1+g2)/2,'-r');hold on;grid on;
plot (r,(f1+f2)/2,'-r');hold on;grid on;
title(['tiempo=' num2str(t*dt),'mins']);grid on;
else
end
end
end

```

Resultados:

En el siguiente par de gráficas se puede observar la evolución de los perfiles de concentración de sustrato y producto en el interior de un pellet esférico, calculados mediante los métodos numéricos de diferencias finitas y redes de Boltzmann. Obsérvese la tendencia hacia el mismo estado estacionario cuando el tiempo tiende a ser muy grande. Sin embargo existen grandes diferencias entre las dos aproximaciones numéricas. En este caso la aproximación más confiable es la de los autómatas celulares en retículas de Boltzmann, pues como ya se demostró en 4.3.6, el método más exacto para la difusión sin reacción química en coordenadas esféricas, es el de redes de Boltzmann.

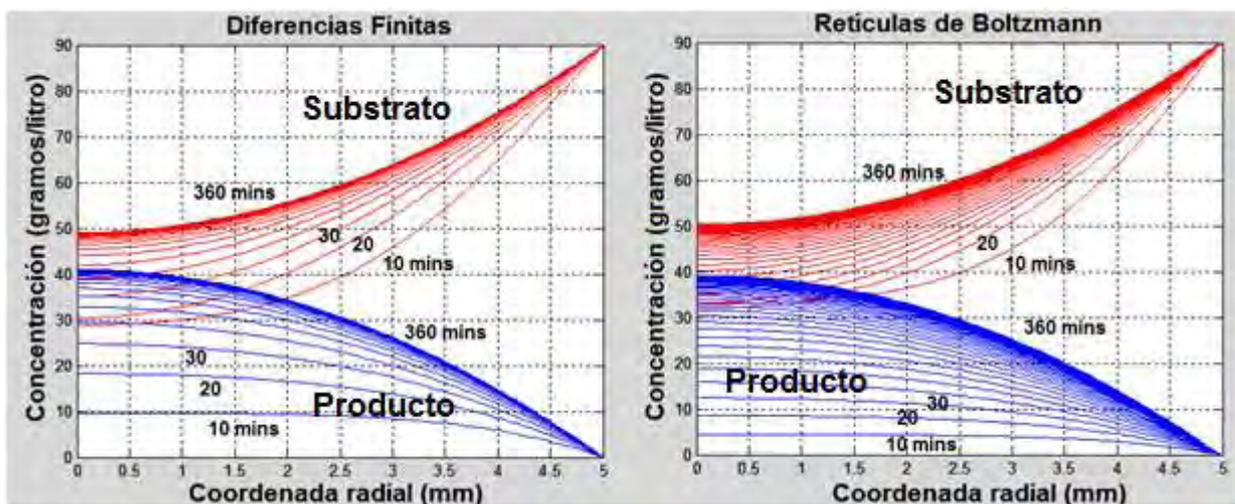


Figura 4.18 Resultados de la simulación de la reacción enzimática tipo Michaelis-Menten llevándose a cabo en el interior de un pellet esférico. El resultado más confiable es el de redes de Boltzmann.

Nótese también que la aproximación burda de diferencias finitas predice una mayor rapidez de crecimiento de la concentración del producto dentro de los pellets esféricos.

Si la concentración en solución dentro del biorreactor es homogénea e igual a la concentración en la superficie de los pellets, 90 gramos/litro, la evolución de los perfiles de concentración de substrato y producto en el interior de los pellets es como se muestra en la gráfica de la red de Boltzmann. Por lo tanto, el algoritmo en redes de Boltzmann presentado aquí, puede servir para determinar, con precisión, el tiempo de procesamiento del biorreactor para una conversión dada, así como el diámetro de los pellets. La cinética tipo Michaelis-Menten introducida en el algoritmo puede ser fácilmente cambiada para cualquier reacción específica con cualquier modelo cinético, ya sea con inhibición o sin inhibición. En este trabajo no se quiso especificar alguna reacción en particular. Se consideró más conveniente armar el código de manera que pudiese ser utilizado en cualquier aplicación.

Bibliografía

[1] Villadsen, John; Nielsen, Jens; Lidén, Gunnar. (2013) Bioreaction Engineering Principles, Third Edition. Springer.

[2] Doran, Pauline.(2013) Bioprocess Engineering, 2nd edition. Academic Press. Elsevier

[3] Simpson, Ricardo; Sastry, Sudhir K. (2013). Chemical and Bioprocess Engineering. Springer. Libro de texto con ejercicios. Contiene fundamentos de diseño, simulación, optimización y control de biorreactores.

[4] Cabral, Joaquim M.S.(2001). Multiphase Bioreactor Design. Taylor and Francis, London.

[5] Lim, Henry C. and Shin,Hwa Sung. (2013), Fed-Batch Cultures, Principles and applications of semi-batch bioreactors. New York

[6] Zheng, Yiszhou; Gu, Tingyue. (1997). Analytical Solution to a Model for the Startup Period of Fixed-Bed Reactors. Chemical Engineering Science, Vol. 15, No. 5, 3773-3779.

[7] Glasgow, Larry A. (2011). Transport Phenomena, an introduction to advanced topics. Wiley

[8] Bird, R. B.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. (2002). Transport Phenomena. 2nd Edition. Wiley

Capítulo 5

Dinámica de Biorreactores Microbianos

Resumen:

Se realiza el análisis matemático de la dinámica de Biorreactores microbianos que utilizan la bacteria *Zymomonas mobilis* alimentada con glucosa para la producción de etanol. Se considera la presencia de una especie enzimática E que se genera durante el cultivo de la bacteria^[1]. La dinámica poblacional provoca oscilaciones periódicas en la dinámica de Biorreactores CSTR tanto en las concentraciones de reactivo y producto como en ambas especies biológicas. Sin embargo las oscilaciones desaparecen cuando se opera con otro tipo de reactor. En este trabajo se utilizan datos reportados en la literatura científica y se formulan algoritmos computacionales propios basados en la discretización del conjunto de ecuaciones diferenciales acopladas no lineales que gobiernan los procesos. Se consideran Biorreactores tipo PFR y de Membrana; en este último reactor se llevan a cabo dos operaciones de manera simultánea, que son la reacción bioquímica y la separación de los productos, por medio de una membrana semipermeable.

5.1 Reactores de flujo en pistón para crecimiento microbiano en estado estacionario

En el reactor de flujo en pistón ideal la distribución de todos los reactivos y productos es uniforme en un plano normal al flujo de la corriente de proceso. Cuando se encuentran involucradas dos fases, esta suposición significa que no hay deslizamiento entre ellas. Sin embargo, en sistemas líquido-gaseosos, aun cuando la velocidad de la corriente gaseosa puede ser mucho más alta que la de líquido, la fase líquida puede ser modelada mediante el uso de consideraciones de flujo en pistón, con algunos ajustes en la mayoría de los casos.

Las ventajas del reactor de flujo en pistón, correspondientes a simplicidad en su construcción, ausencia de dispositivos mecánicos y volumen mínimo requerido para reacciones químicas de primer orden, ha animado a varios intentos para cultivar células en tales equipos.

La ecuación de diseño para la operación en régimen estacionario de un reactor de flujo en pistón, puede encontrarse en cualquier libro de texto de ingeniería de reactores, por ejemplo el de Levenspiel "Ingeniería de las reacciones químicas", dicha ecuación es la siguiente:

$$\frac{V}{F_{A0}} = \frac{\tau}{C_{A0}} = \int \frac{dC_A}{-r_A} \text{ --- (5.1)}$$

En esta ecuación V es el volumen del reactor, F_{A0} es el flujo molar del reactivo A , C_{A0} es la concentración del reactivo en la entrada, $-r_A$ es la rapidez con la que se consume el reactivo, C_A es la concentración de A en cualquier coordenada de posición a lo largo del reactor, y τ es el tiempo de residencia.

En términos de conversiones:

$$\frac{V}{Q} = \tau = \int_{x_{entrada}}^{x_{salida}} \frac{dx}{-r} \quad (5.2)$$

Ahora Q representa el flujo volumétrico y x_A es la conversión fraccional.

Como ejemplo consideraremos que r_A esté dado por el modelo logístico:

$$-r_A = \mu_{max} x_A \left(1 - \frac{x_A}{x_t}\right) \quad (5.3)$$

En este caso x_A representa a la concentración de las células. Entonces la ecuación de operación del biorreactor PFR en estado estacionario queda dada por:

$$\tau = \frac{1}{\mu_{max}} \int_{x_0}^x \frac{dx}{x \left(1 - \frac{x}{x_t}\right)} \quad (5.4)$$

Donde se ha eliminado el subíndice A para simplificar notación. Integrando:

$$\tau = \frac{1}{\mu_{max}} \left[\ln \frac{x}{x_0} - \frac{1}{x_t} \ln \frac{x_t - x}{x_t - x_0} \right] \quad (5.5)$$

Esta ecuación da una indeterminación si se substituye $X_0 = 0$, lo cual es correcto, pues si no existen células en la alimentación, obviamente no se pueden multiplicar. Las células pueden ser alimentadas como inóculum fresco, aunque también se puede reciclar corriente de producto.

Cuando la concentración de substrato es de interés principal, es preferible utilizar expresiones matemáticas en términos de la concentración de substrato (S) en lugar de la población celular (x). Las ecuaciones que se obtienen son similares a las de un reactor Batch, como puede observarse en el caso en el que el crecimiento celular sea de primer orden y el consumo de substrato esté exclusivamente asociado a dicho crecimiento.

Por ejemplo, para el reactor batch, considerando a x_0 como la concentración celular inicial y a S_0 como la concentración inicial de substrato:

$$x = x_0 + \frac{S_0 - S}{Y_{S/X}} \quad (5.6)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} x \quad (5.7)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS}{dx} \frac{dx}{dt} = Y_{S/X} \mu_{max} \left(x_0 + \frac{S_0 - S}{Y_{S/X}} \right) \text{--- -- (5.8)}$$

$$\mu_{max} \int_0^t dt = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{x_0 Y_{S/X} + S_0 - S} \text{--- -- (5.9)}$$

Consecuentemente:

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(\frac{x_0 Y_{S/X} + S_0 - S}{x_0 Y_{S/X}} \right) \text{--- -- (5.10)}$$

Luego, para un reactor de flujo en pistón con el volumen del reactor, V, como variable independiente:

$$\frac{dS}{dV} = \frac{dS}{dx} \frac{dx}{dV} = -Y_{S/X} \frac{r_X}{Q} = \frac{-Y_{S/X}}{Q} \mu_{max} x = \frac{-Y_{S/X}}{Q} \mu \left(x_0 + \frac{S_0 - S}{Y_{S/X}} \right) \text{--- -- (5.11)}$$

Entonces:

$$\frac{\mu_{max}}{Q} \int_0^V dV = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{x_0 Y_{S/X} + S_0 - S} \text{--- -- (5.12)}$$

Por lo tanto el volumen del reactor es:

$$V = \frac{Q}{\mu_{max}} \ln \left(\frac{x_0 Y_{S/X} + S_0 + S}{x_0 Y_{S/X}} \right) \text{--- -- (5.13)}$$

Consecuentemente para este caso, el tiempo de residencia en el reactor PFR es idéntico al tiempo de operación del reactor batch

$$\tau = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(\frac{x_0 Y_{S/X} + S_0 - S}{x_0 Y_{S/X}} \right) \text{--- -- (5.14)}$$

Estos resultados han sido obtenidos para cinéticas simples; para casos más difíciles de integrar se pueden requerir métodos analíticos más sofisticados o técnicas numéricas de integración para calcular los tiempos de residencia.

5.2 Fermentador de glucosa con *Zymomonas mobilis*.

En 2010, la estudiante colombiana de Doctorado Isabel Cristina Paz Astudillo^[1], de la Universidad Nacional de Colombia con sede en Manizales, presentó en su tesis doctoral, un modelo cinético para la fermentación de glucosa en biorreactores de flujo continuo de mezcla completa, utilizando cultivos bacterianos de *Zymomonas mobilis* como agente fermentador. Su objetivo era optimizar las condiciones de operación para obtener un mejor rendimiento de etanol, utilizando como variables al tiempo de residencia (la inversa de la rapidez de dilución) y la concentración del sustrato en la alimentación. La formulación del modelo que ella usó se basa en la inhibición de un componente clave denominado "E", el cual se asume, que está directamente relacionado con la producción de etanol.

Cabe mencionar que, en el diseño de la mayoría de los reactores, los ingenieros toman en cuenta condiciones de estado estacionario, sin preocuparse de la dinámica del sistema, pero existen varios reportes en la literatura científica de varios accidentes que han ocurrido por las fuertes oscilaciones de concentración y temperatura durante el arranque de reactores de flujo continuo de mezcla completa^[2]. Con los Biorreactores también pueden ocurrir oscilaciones de la concentración de sustrato y producto durante el arranque y estas oscilaciones pueden autosostenerse durante mucho tiempo, y debido a esto es necesario tomar en cuenta la dinámica para el diseño y optimización de un biorreactor.

Como se mencionó en el capítulo 4, la ecuación de diseño de un reactor CSTR, operando en estado estacionario es:

$$\tau_{CSTR} = \frac{C_{A,sal} - C_{A,ent}}{-r_A} \text{ --- (5.1)}$$

Esta ecuación es la que normalmente se utiliza para diseñar Biorreactores, pero cuando existen oscilaciones en el comportamiento dinámico, es necesario aplicar el análisis matemático para el régimen transitorio. En la figura siguiente se representa un reactor CSTR, dentro del cual se llevará a cabo la fermentación de glucosa con la bacteria *Zymomonas mobilis*.

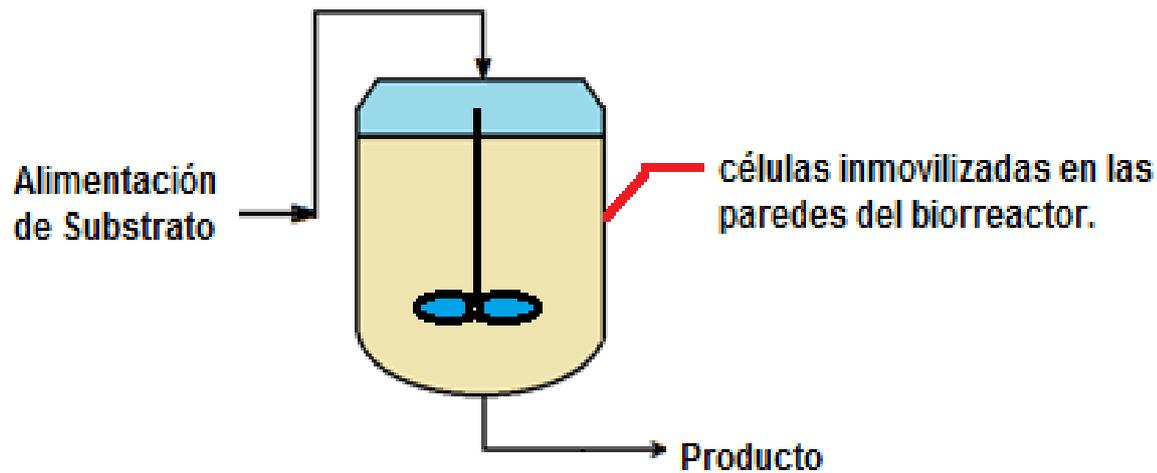


Figura 5.1. Representación esquemática del biorreactor de flujo continuo de mezcla completa.

Las propiedades de los microorganismos afectan la eficiencia de los bioprocesos y pueden ser manipuladas durante el diseño de los Biorreactores, dichas propiedades son pH, temperatura, concentración y flujo. Estos poseen ventajas y desventajas; el éxito de las fermentaciones depende de lograr un buen equilibrio entre los factores que intervienen en el proceso, incluyendo el comportamiento dinámico del sistema.

Las propiedades bioquímicas del microorganismo (pH, temperatura y concentración) definen las condiciones de operación y como consecuencia influyen en la producción y el rendimiento.

Durante los últimos años se ha investigado la fermentación de glucosa para producir etanol mediante el uso de diferentes microorganismos. De ellos el más frecuentemente utilizado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; pero también se ha estudiado ampliamente las fermentaciones con la bacteria *Zymomonas mobilis*; y algunos investigadores sugieren el remplazo de la levadura debido a que la *Zymomonas* poseen características favorables.

La tabla siguiente resume las condiciones de operación para fermentaciones con estos dos microorganismos, reportados en la literatura reciente:

Tabla 5.1 Propiedades y condiciones de operación para fermentaciones con *Z.mobilis* y *S.cerevisiae*.

Zymmomonas mobilis	Saccharomyces cerevisiae	
Utiliza principalmente glucosa. El uso de sacarosa conduce a la producción de altas concentraciones de subproductos.	Puede utilizarse para la fermentación de diferentes sustratos: glucosa, maltosa, galactosa, fructosa y sacarosa.	Kosaric and Vardar-Sukan, 2001.
pH _{operación} =4.0-5. T _{operación} =30-40 °C	pH _{operación} =3.5-6.0. T _{operación} =28-35 °C	Kosaric and Vardar-Sukan, 2001.
Con cepas comunes la población crece sin inhibición cuando se utilizan concentraciones de hasta 100 gr/lit de glucosa. Cepas modificadas alcanzan a procesar hasta 400 gr/lit	Ocurre inhibición por parte del sustrato a partir de concentraciones por arriba de 150 gr/lit	Favela, 2005; Lenbury et al, 1999.
Inhibición por parte del producto (etanol) a partir de concentraciones mayores a 60 gr/lit	Inhibición completa por etanol a concentraciones mayores a 110 gr/lit	Banfrcova et al, 1999; Brown et al, 1981; Laopaiboon et al, 2009; Thomas et al, 1996.
Fermentación anaeróbica	Requiere oxígeno (0.05 a 0.1 mm Hg); valores más altos promueven el crecimiento de la población celular	Kosaric and Vardar-Sukan, 2001.
Rendimiento teórico = 0.49 gr etanol/gr glucosa.	Rendimiento teórico = 0.51 gr etanol/gr glucosa.	Claasen et al, 1999; Ingledew, 1999; Lee et al., 1980.
Rendimiento real= 97% del rendimiento teórico máximo; debido a la síntesis de biomasa y reacciones para mantenimiento.	Rendimiento real= 90 a 95% del rendimiento teórico máximo	
Coproductos: altas cantidades de ácidos orgánicos, acético y láctico principalmente	Principal coproducto es el glicerol (1% en volumen) más algunos ácidos orgánicos y alcoholes más pesados.	Favela, 2005.

Fuente: [2] Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. (2005) Experimental Investigation and Confirmation of Static/Dynamic Bifurcation Behavior in a Continuous Ethanol Fermentor. Ind. and Eng. Chemical Research 44:2525-2531.

5.3 Cinética para la fermentación de glucosa con *Zymmomonas mobilis*.

Con base en el estudio realizado por Garhyan y Elnashaie en 2005^[2], las expresiones cinéticas de la dinámica microbiana desarrollándose dentro de un reactor de flujo continuo de mezcla completa, utilizando cultivos de *Zymmomonas mobilis* como agente fermentador, son las que se presentan a continuación (ver nomenclatura al final de este capítulo).

$$\frac{dC_s}{dt} = D(C_{sf} - C_s) - R_s \quad (5.2)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = D(C_{pf} - C_p) + R_p \quad (5.3)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = D(C_{xf} - C_x) + R_x \quad (5.4)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = D(C_{ef} - C_e) + R_e \quad (5.5)$$

$$R_s = \left(\frac{1}{Y_{sx}} \mu + m_s \right) C_x \quad (5.6)$$

$$R_p = \left(\frac{1}{Y_{px}} \mu + m_p \right) C_x \quad (5.7)$$

$$R_s = \mu C_s \quad (5.8)$$

$$R_x = \mu C_x \quad (5.9)$$

$$R_e = (K_1 - K_2 C_p + K_3 C_p^2) \mu C_x \quad (5.10)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \frac{C_e}{C_x} \quad (5.11)$$

Este es un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas no lineales que pueden resolverse mediante los tradicionales métodos de Euler o Runge-Kutta.

5.4 Dinámica de un fermentador CSTR, utilizando *Zymmomonas mobilis*.

La búsqueda de las condiciones de operación para que un sistema reaccionante operando dentro un biorreactor CSTR, dé lugar a oscilaciones sostenidas, suele ser bastante complicada y consumidora de tiempo.

Después de llevar a cabo una búsqueda exhaustiva, sobre la dinámica del biorreactor con *Zymmomonas mobilis*, se logró encontrar las condiciones de flujo volumétrico y concentraciones de las especies involucradas, que dan lugar a un comportamiento oscilatorio sostenido en la dinámica del biorreactor. En este trabajo se reporta la dinámica del fermentador con *Zymmomonas*, bajo diferentes condiciones.

5.4.1 Algoritmo computacional:

El siguiente algoritmo formulado en Matlab, basado en el método de Euler, permite analizar la dinámica del fermentador. Paz Astudillo [1] explora el comportamiento dinámico llegando a un dominio muy distinto de la solución del sistema de ecuaciones diferenciales que el reportado aquí. Bajo las condiciones de operación especificadas en nuestro código computacional, el sistema evoluciona hacia un ciclo límite en el diagrama de espacio-fase (figura 5.2), correspondiente a oscilaciones de amplitud invariante en las concentraciones durante la fermentación:

```
function zym1
clear all;close all;clc;
mumax=1;Ysx=2.44498e-2;Ypx=5.26315e-2;ms=2.16;mp=1.1;
k1=16;k2=0.497;k3=3.83e-3;ks=.5;deltat=.000125;
    D=.025;%Relación de Dilución (inverso del tiempo de residencia)
    Cxf=0;Cpf=0;Cef=0;Csf=140;%(concentraciones de la alimentación)
    Cs=60;Ce=0.00001;Cx=7.5;Cp=20;%condiciones iniciales dentro del reactor
for t=1:2400000*2%Inicia ciclo de tiempo
%cálculos de rapidez de conversión del modelo de Monod
mu=mumax*Cs/(ks+Cs)*Ce/Cx;%
Rs=(1/Ysx*mu+ms)*Cx;%rapidez de consumo del sustrato
Rp=(1/Ypx*mu+mp)*Cx;%rapidez de producción de etanol
Rx=mu*Cx;%rapidez de crecimiento de la Zymmomonas mobilis
Re=(k1-k2*Cp+k3*Cp^2)*mu*Cx;%rapidez de crecimiento de la especie E
Cs=Cs+deltat*(D*(Csf-Cs)-Rs);%evolución de la concentración de sustrato
Cp=Cp+deltat*(D*(Cpf-Cp)+Rp);%evolución de la concentración de producto
Cx=Cx+deltat*(D*(Cxf-Cx)+Rx);%evolución de concentración de Z. mobilis
Ce=Ce+deltat*(D*(Cef-Ce)+Re);%evolución de la concentración de especie E
    contar =t/5000;
%desplegado gráfico
if (contar-ceil(contar))==0)
    figure (1);
    plot (t*deltat,Cs,'.-');
    hold on;
    plot (t*deltat,Cp,'.-r');
    hold on;
    figure (2);plot (t*deltat,Ce,'.r');
    hold on;
    plot (t*deltat,Cx,'.g');
    hold on;
else
end
end
figure (1);grid on;
figure (2);grid on;
```

5.4.2 RESULTADOS

La figura que se muestra a continuación muestra los resultados de las oscilaciones periódicas de las concentraciones, que se producen dentro del fermentador:

$C_{s0} = 60$ g/lit de reactor; (concentración inicial de sustrato dentro del reactor).

$C_{e0} = 10^{-5}$ g/lit de reactor; (concentración inicial de especie E).

$C_{x0} = 7.5$ g/lit de reactor; (concentración inicial de *Zymomonas Mobilis*).

$C_{p0} = 20$ g/lit de reactor; (concentración inicial de producto).

$C_{xf}=C_{pf}=C_{ef}=0$; (Concentración en la corriente de alimentación)

$C_{sf}=140$ g/lit; (Concentración del sustrato en la corriente de alimentación)

$D = .025$; (relación de dilución= Q/Vol)

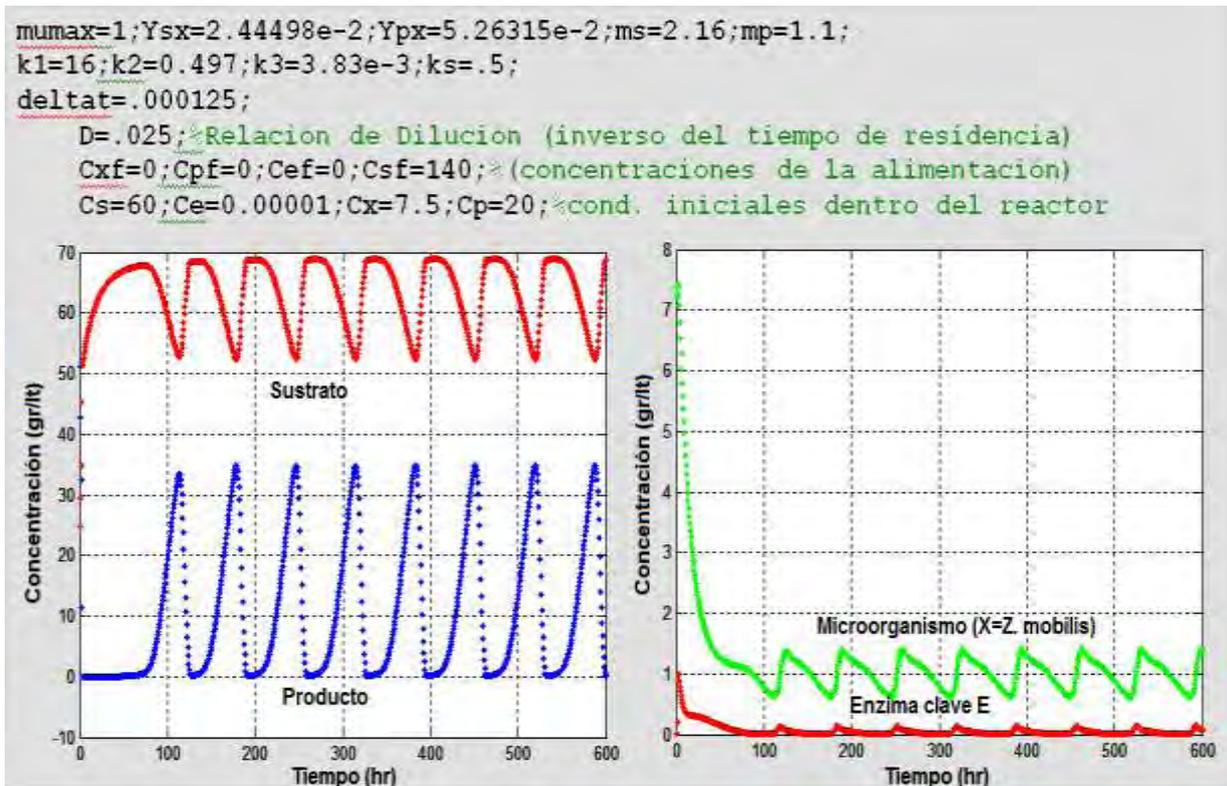


Figura 5.2 Oscilaciones Sostenidas (de amplitud invariante) dentro del fermentador de glucosa con *Zymomonas Mobilis*.

Los diagramas de espacio-fase para este sistema, bajo las condiciones especificadas, se muestran en la siguiente figura:

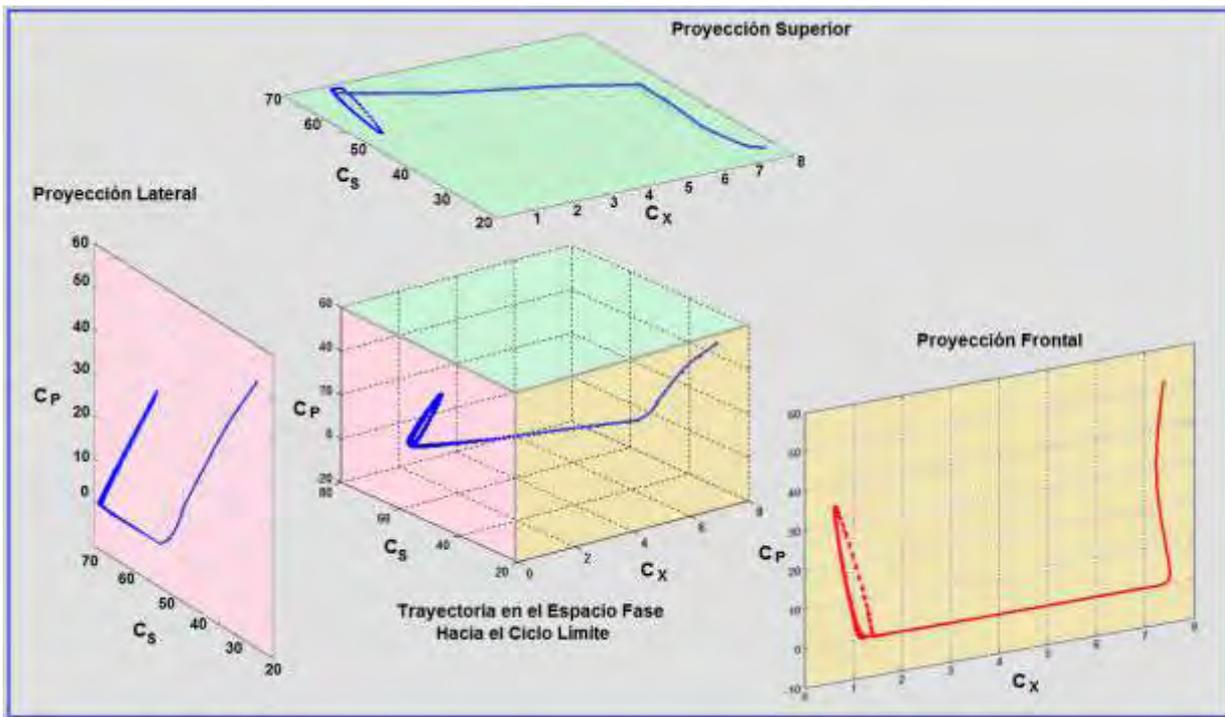


Figura 5.3. Ruta del sistema dinámico en su trayectoria hacia el ciclo límite en el diagrama de espacio-fase, y proyecciones en gráficas bidimensionales

El parámetro que tiene mayor influencia sobre el comportamiento dinámico del fermentador es la rapidez de dilución (D). Modificando esta variable y manteniendo todos los demás parámetros en los valores asignados en el caso anterior, se obtienen oscilaciones amortiguadas, como se muestra a continuación

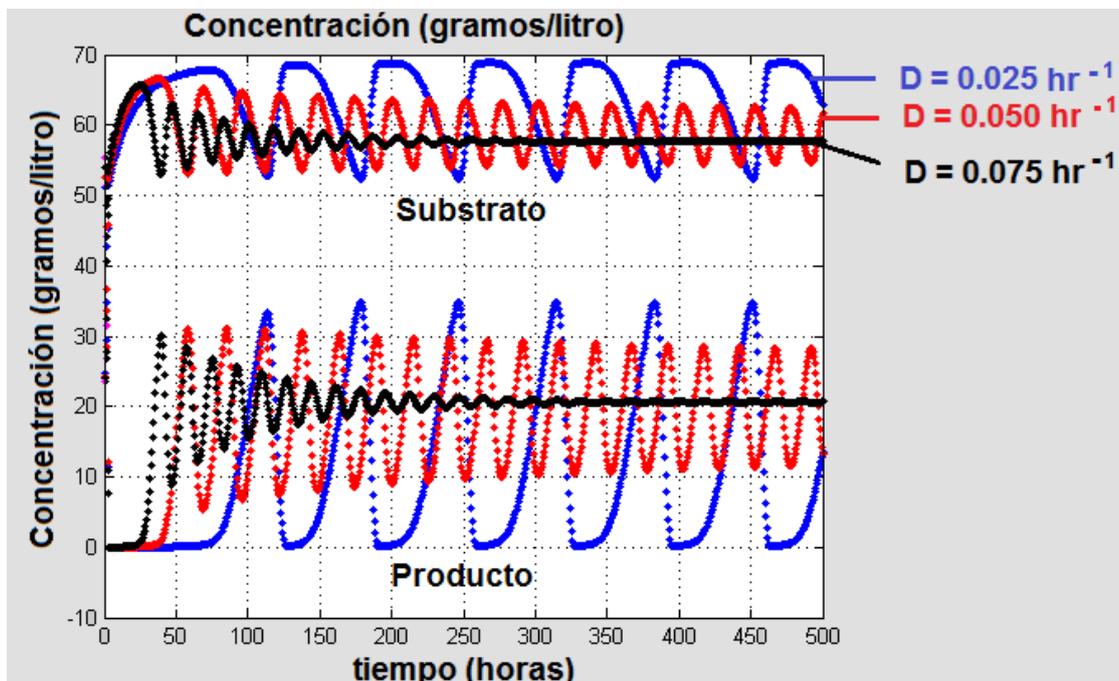


Figura 5.3 Oscilaciones sostenidas y amortiguadas, obtenidas al operar el fermentador con *Z. mobilis* bajo diferentes relaciones de dilución

Puede observarse que la mayor concentración de producto que se obtiene durante las oscilaciones sostenidas corresponde a 34.5 %, para una rapidez de dilución de 0.025 hr⁻¹. Sin embargo el sistema es oscilatorio. El diseño de un sistema de control permitiría mantener al reactor funcionando bajo una concentración máxima de producto cercano a ese 34.5%. Esa sería una tarea interesante, el controlador se diseñaría con base a una acción integral –proporcional o integral-proporcional-derivativa. Sin embargo otra forma de optimizar la concentración final del producto es explorar la dinámica del biorreactor hasta hallar los parámetros que permiten maximizar.

Enseguida se presenta un algoritmo de cómputo (zymoptdil) que permite explorar el dominio de la solución de las ecuaciones diferenciales gobernantes para maximizar la concentración. Se considera que la concentración inicial del producto dentro del reactor y en la corriente de alimentación es igual a cero; que la concentración inicial del sustrato dentro del reactor es igual 100, 150 en la corriente de alimentación y la concentración inicial de microorganismos es igual a 7.5, todo en gr/lit.

```
function zymoptdil
clear all;close all;clc;
mumax=1;
Ysx=2.44498e-2;%coeficiente estequiométrico sustrato/microorganismos
Ypx=5.26315e-2;%coeficiente estequiométrico producto/microorganismos
ms=2.16;%masa límite de sustrato
mp=1.1;%masa límite del producto
k1=16;k2=0.497;k3=3.83e-3;ks=.5;%coeficientes cinéticos
y(1:10)=0;%dimensionamiento del vector de concentración de producto
for i=1:120
deltat=.000125;%paso de tiempo
    D=0.0599+(i-1)*.00001*1;%Relación de Dilución (inverso del tiempo de residencia)
    Cxf=0;Cpf=0;Cef=0;Csf=150;%(concentraciones de la alimentación)
    Cs=100;Ce=0.00001;Cx=7.5;Cp=0;%condiciones iniciales dentro del reactor
for t=1:2400000%Inicia ciclo de tiempo
%cálculos de rapidez de conversión del modelo de Monod
mu=mumax*Cs/(ks+Cs)*Ce/Cx;%
Rs=(1/Ysx*mu+ms)*Cx;%rapidez de consumo del sustrato
Rp=(1/Ypx*mu+mp)*Cx;%rapidez de producción de etanol
Rx=mu*Cx;%rapidez de crecimiento de la Zymomonas mobilis
Re=(k1-k2*Cp+k3*Cp^2)*mu*Cx;%rapidez de crecimiento de la especie E
Cs=Cs+deltat*(D*(Csf-Cs)-Rs);%evolución de la concentración de sustrato
Cp=Cp+deltat*(D*(Cpf-Cp)+Rp);%evolución de la concentración de producto
Cx=Cx+deltat*(D*(Cxf-Cx)+Rx); %evolución de la concentracn de Z. mobilis
Ce=Ce+deltat*(D*(Cef-Ce)+Re); %evolución de la concentracn de especie E
contar =t/3000;
end
y(i)=Cp;figure (2);plot (D,Cp,'. ');hold on;
end
grid on;
```

5.4.3 Optimización de las condiciones de operación del reactor CSTR.

Como se puede observar al variar la rapidez de dilución se obtiene una concentración de producto diferente a la salida. Es posible optimizar el rendimiento del producto; sin embargo el proceso es multivariable. Para optimizar la operación sin tener que recurrir a un método sofisticado como los algoritmos genéticos, en este trabajo se considera que la concentración del sustrato en la alimentación permanece fija en 150 g/lit de reactor y se hace variar progresivamente la rapidez de dilución. Las concentraciones iniciales de sustrato, microorganismos, enzima clave y producto, dentro del reactor, son de 100, 7.5, 10^{-5} y 0 gr/lit, respectivamente. El resultado es la siguiente gráfica:

X

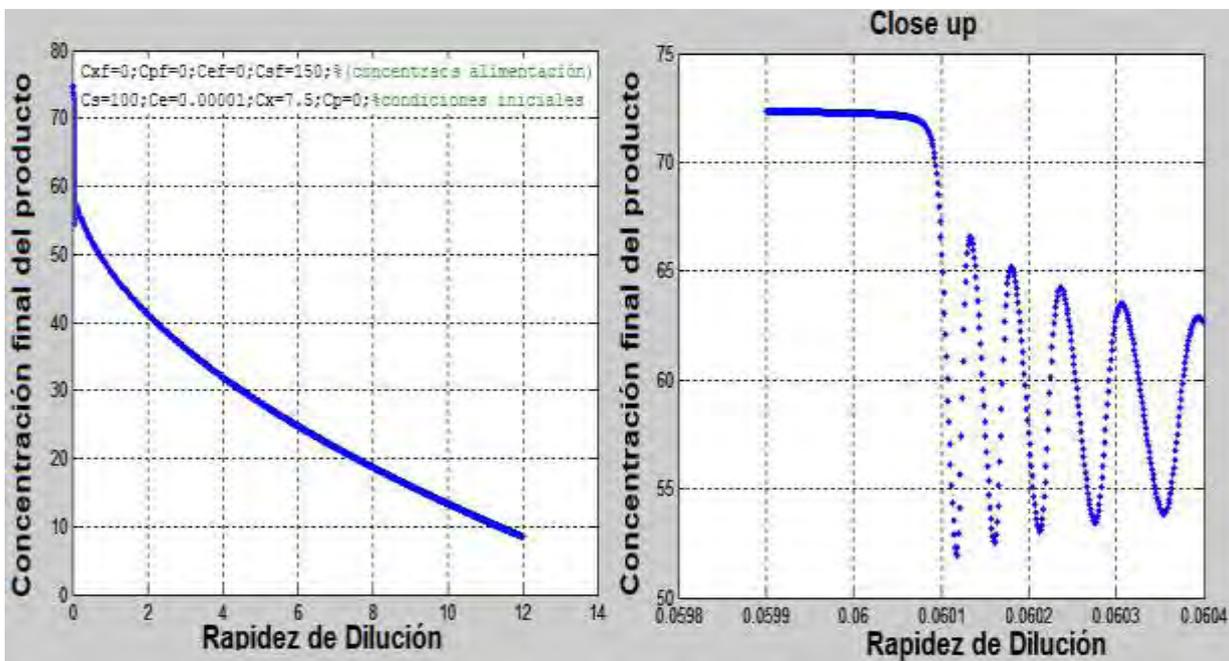


Figura 5.4 Grafica de concentración de producto a la salida del biorreactor CSTR, a diferentes rapidezces de dilución.

Como puede observarse la concentración final del producto decrece monótonamente a medida que aumenta la rapidez de dilución. De acuerdo al modelo matemático para la cinética microbiana, existe un intervalo a rapidezces de dilución bajas donde se tiene un comportamiento oscilatorio, como puede observarse en la segunda gráfica. Para optimizar la productividad de etanol con este fermentador se grafica el producto de la rapidez de dilución por la concentración final de etanol contra la rapidez de dilución, el resultado se presenta en siguiente figura.

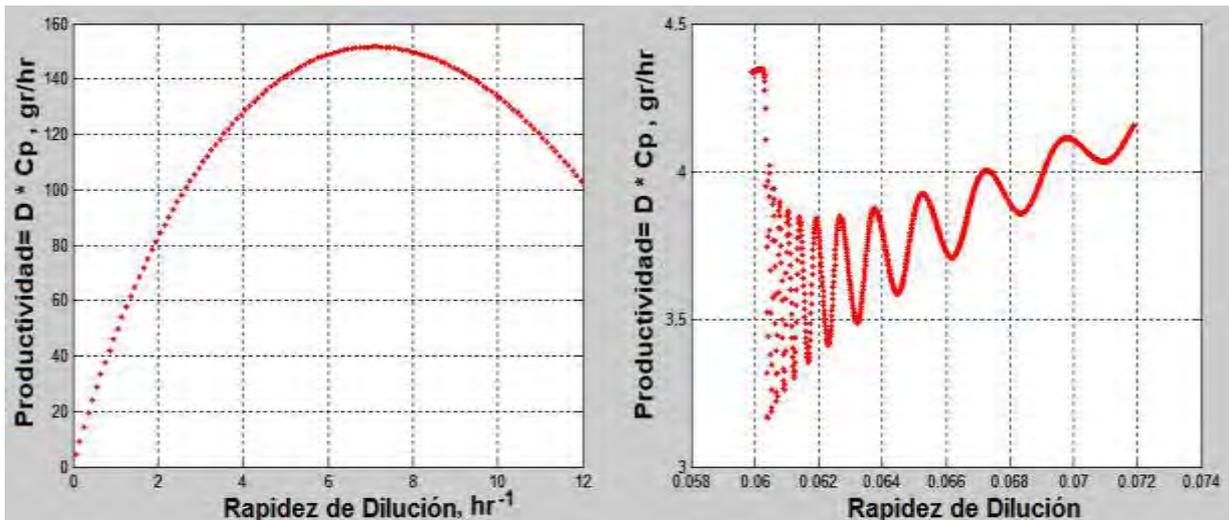


Figura 5.5 Gráfica de productividad contra rapidez de dilución.

De acuerdo a este par de gráficas, el comportamiento tiende a ser oscilatorio a pequeñas rapideces de dilución, dando lugar a bajas productividades; pero después empieza a crecer rápidamente hasta alcanzar un máximo de 151.6 gramos/hr que se encuentra a una rapidez de dilución de 7.16 hr^{-1} , lo cual quiere decir que conviene operar el fermentador a dicha rapidez de dilución para optimizar la productividad.

Se puede mejorar la productividad, modificando la concentración del sustrato en la corriente de alimentación, y por ejemplo, mantener los demás parámetros constantes. Esto conduce a la siguiente gráfica:

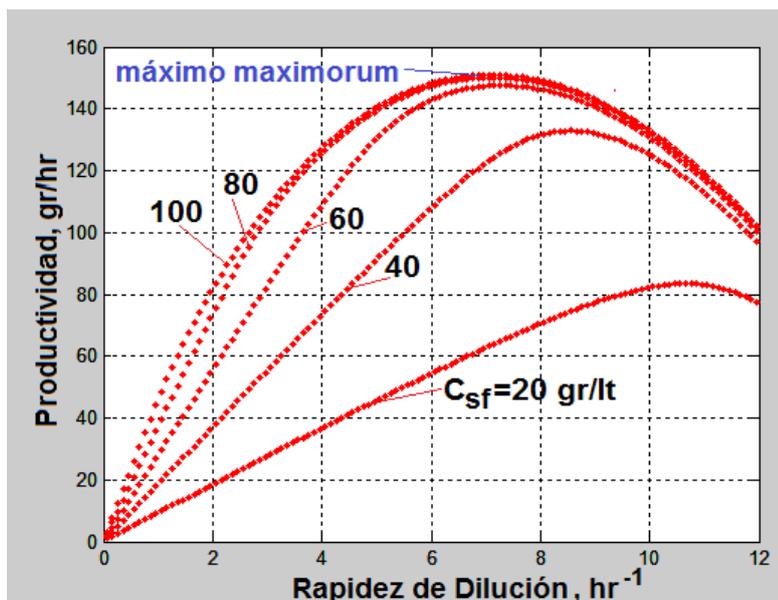


Figura 5.6. Máximo maximorum de la concentración del producto

Entonces, manteniendo la concentración inicial de microorganismos en 7 g/lit y sin presencia de producto dentro del biorreactor al principio de la operación, se puede observar que existe un máximo con respecto a la rapidez de dilución de 7.16 hr^{-1} ; esto ocurre cuando la concentración de sustrato en la corriente de alimentación es mayor a 80 g/lit, pero la productividad permanece prácticamente invariante, por lo tanto no es recomendable introducir grandes cantidades de glucosa, porque lo que no se fermenta se tiene que separar para después recircular, si no que se quiere desperdiciar materia prima.

Cuando se cambia la concentración inicial de microorganismos a 3 g/lit o a 15 g/lit, la rapidez de dilución óptima que se obtiene es de 7.05 y la productividad correspondiente 150.9 g/hr, en ambos casos, es decir la concentración inicial dentro del biorreactor no es factor determinante, por lo tanto el factor importante en la optimización de las condiciones de operación en este fermentador es la rapidez de dilución, maximizando la productividad.

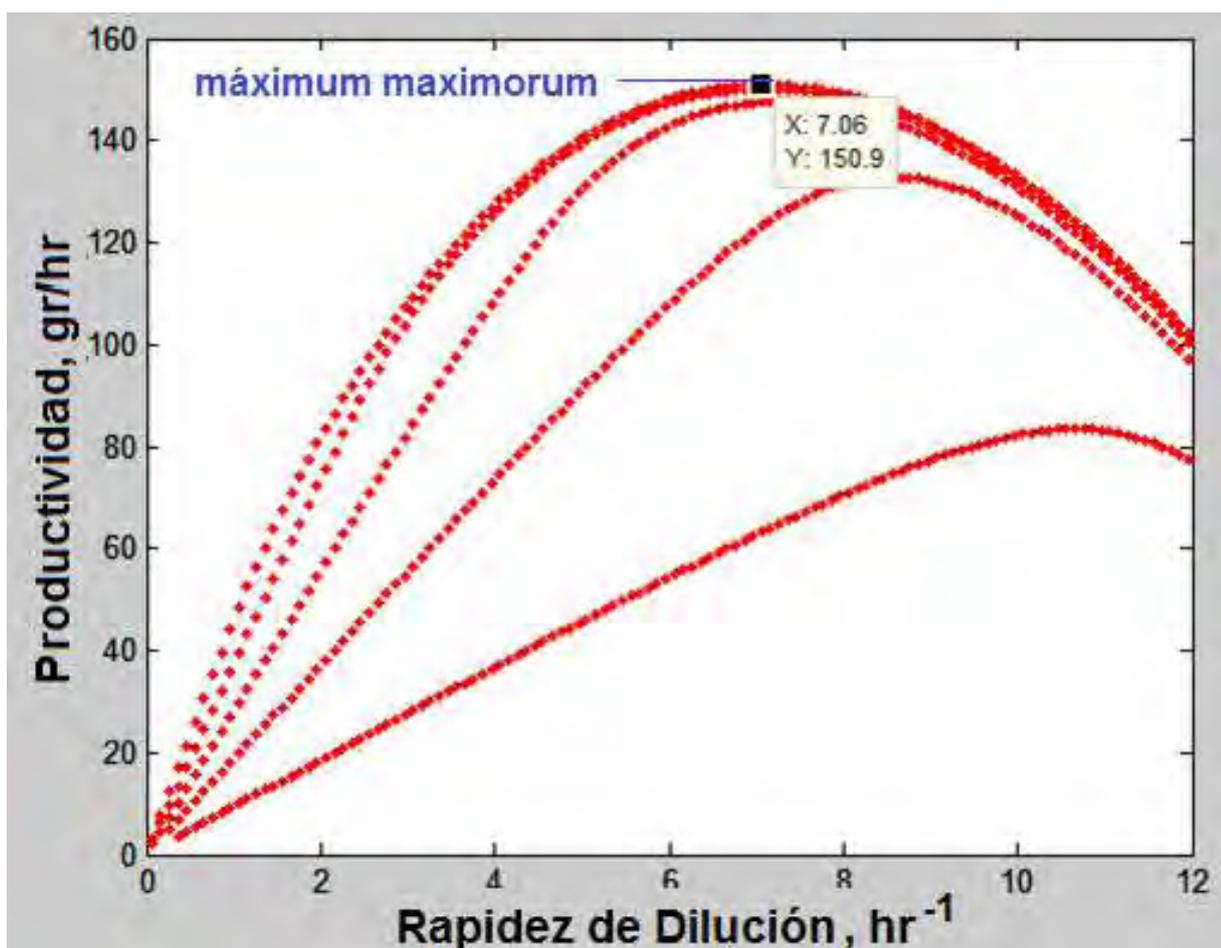


Figura 5. 7 Conclusiones respecto a la optimización del reactor

5.5 Reactor microbiano de membrana con células inmovilizadas

Una de las áreas emergentes en ingeniería y tecnología es la intensificación de procesos. Dicho término fue definido a principios del nuevo milenio en la comunidad de Ingenieros Químicos como “el desarrollo de nuevos aparatos y técnicas que, comparadas a las tradicionales, permiten mejoras dramáticas en manufactura y procesamiento, disminuyendo substancialmente el tamaño de los equipos, el consumo de energía y la producción de residuos, para una capacidad de producción dada, resultando por lo tanto en procesos más baratos y sustentables” (Moulijn, 2000). Este concepto ha permeado rápidamente a la ingeniería bioquímica.

El uso de reactores enzimáticos de membrana es un ejemplo de intensificación de procesos en la ingeniería de alimentos. En ellos se lleva a cabo simultáneamente la biocatálisis y la separación por membrana, convirtiéndose en una alternativa viable con respecto a los biorreactores convencionales de lecho fijo y lecho fluidizado.

La característica básica de los reactores de membrana es la separación de la enzima, los productos y los sustratos mediante una membrana semipermeable que crea una barrera físico-química selectiva. Los sustratos y productos permeables pueden ser separados selectivamente de la mezcla reaccionante mediante la acción de una fuerza impulsora correspondiente a un potencial químico, un gradiente de presión, o un campo eléctrico, etc., que se forma a lo largo de la membrana y que provoca el movimiento de las especies químicas por difusión, convección, o migración electroforética, etc. Mientras tanto la enzima es retenida dentro de la membrana, permitiendo que se lleve a cabo una operación continua con el sustrato como corriente de alimentación y la mezcla de productos como corriente de salida.

Las membranas pueden ser utilizadas en un biorreactor exclusivamente como una matriz con propósitos de inmovilización del biocatalizador (membrana reactiva), sin ningún propósito de separación, sin embargo el término de “biorreactor de membrana” se aplica a los equipos en los que la membrana no solo funciona como soporte de la enzima sino que también cumple con propósitos de separación. Los procesos de separación convencionales requieren como agente de separación alguna forma de energía (por ejemplo destilación) o algún agente químico (por ejemplo en extracción líquido-líquido). Los biorreactores de membrana son menos complejos y más eficientes en el consumo de energía que los procesos convencionales.

El siguiente esquema representa un biorreactor de membrana típico. Se trata de una cámara cilíndrica en cuyo interior se ha colocado, de manera concéntrica, un tubo cilíndrico que consiste de un soporte macroporoso y una capa activa en la superficie interior. La enzima es inmovilizada en el interior del soporte macroporoso por alguna técnica adecuada. El espesor de la superficie activa es pequeño, mientras que el del soporte enzimático es grande. El sustrato se alimenta por el extremo superior de la figura y fluye a través de la región anular de la cámara, llevándose a cabo un transporte de masa antirradial a través de la membrana macroporosa. Después de llevarse a cabo la reacción enzimática, la mezcla de productos fluye al canal central,

denominado lumen. La corriente de salida recibe el nombre de permeado y se recolecta en el extremo inferior del aparato.

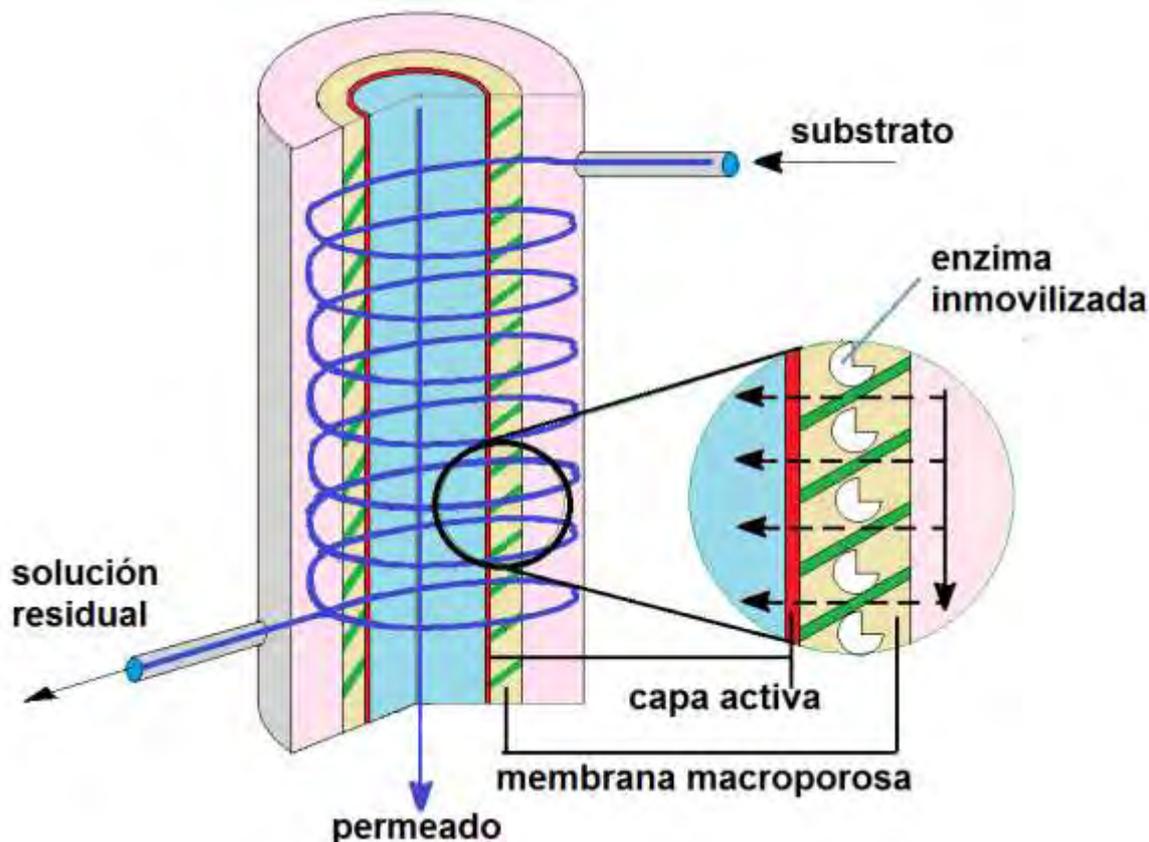


Figura 5.8 Biorreactor de membrana

5.5.1 Perfiles de velocidad en el biorreactor de membrana

Para llevar a cabo la modelación matemática y simulación computacional de este tipo de biorreactor, se considera aquí la producción de etanol a partir de dos substratos, glucosa y xilosa, llevándose a cabo dentro de un reactor de membrana con *Zymomonas mobilis* inmobilizada, tomando en cuenta los datos cinéticos reportados en el artículo de Taphelle Mokomele, Linda H. Callanan y Kim G. Clarke. Sin embargo, en dicho artículo consideran que tanto en la región anular como en el tubo central, el fluido se comporta como si estuviese perfectamente mezclado, suponiendo flujo en pistón a través de la membrana enzimática. En este capítulo se proponen algunas variantes al trabajo de Mokomele et al. En primer lugar se supone flujo laminar en las regiones central y anular del biorreactor. El perfil de velocidades en ambas regiones se calcula a partir de la integración de la ecuación de Navier-Stokes.

Considerando efectos extremos despreciables, la velocidad del fluido dentro del tubo central está dada por el siguiente perfil parabólico:

$$v = v_{max} \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.12)$$

Para la región anular, la ecuación de Navier-Stokes:

$$\rho \left[\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right] = -\nabla \cdot \tau - \nabla P + \rho g \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.13)$$

Se simplifica, considerando que los dos últimos términos correspondientes al gradiente de presión y a la fuerza de gravedad son constantes y agrupándolos en un término al que se le denomina G . Tomando en cuenta además que el término de aceleración espacial es nulo debido a que se tiene una área de flujo de sección transversal constante, la simplificación de esta ecuación en condiciones de estado estacionario conduce a:

$$0 = -\nabla \cdot \tau + G \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.14)$$

La integración de esta ecuación en coordenadas cilíndricas, permite obtener el perfil de esfuerzos cortantes:

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} r \tau_{rz} = G \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.15)$$

Separando variables e integrando:

$$r \tau_{rz} = G \frac{r^2}{2} + c_1 \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.16)$$

Luego, introduciendo el modelo reológico para flujo newtoniano y separando variables se tiene:

$$\left(\frac{Gr}{2} + \frac{c_1}{r} \right) dr = \mu dv \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.17)$$

Integrando sin límites:

$$v = \frac{Gr^2}{4\mu} + \frac{c_1}{\mu} \ln r + c_2 \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.18)$$

Introduciendo las condiciones de frontera:

$$\text{En } r = R_2 \quad v = 0 \quad \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.19)$$

$$\text{En } r = R_3 \quad v = 0 \quad \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.20)$$

Sustituyendo estas condiciones de frontera y realizando el álgebra se obtienen los valores de las constantes de integración:

$$c_1 = \frac{G (R_2^2 - R_3^2)}{4 \ln \left(\frac{R_2}{R_3} \right)} \text{---} \text{---} \text{---} \text{---} (5.21)$$

$$c_2 = -\left(\frac{GR_2^2}{4\mu} + \frac{c_1}{\mu} \ln R_2\right) \dots \dots \dots (5.22)$$

Con lo cual se obtiene finalmente el perfil de velocidades para la región anular:

$$v = \frac{G}{4\mu} \left\{ R_2^2 \left[1 - \left(\frac{r}{R_2}\right)^2 \right] + (R_2^2 - R_3^2) \frac{\ln\left(\frac{r}{R_2}\right)}{\ln\left(\frac{r}{R_3}\right)} \right\} \dots \dots \dots (5.23)$$

5.5.2 Modelo matemático para el biorreactor de membrana

Las ecuaciones diferenciales gobernantes para la región central y la región anular son ecuaciones de difusión-convección, mientras que dentro de la membrana se tiene un fenómeno de difusión con reacción bioquímica, ya que dentro de la membrana se encuentra inmovilizada la *Zymmonas mobilis*.

En la región anular:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -v\nabla S + D\nabla^2 S \dots \dots \dots (5.24)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -v \frac{\partial S}{\partial z} + D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial S}{\partial r} + \frac{\partial^2 S}{\partial r^2} + \frac{\partial^2 S}{\partial z^2} \right] \dots \dots \dots (5.25)$$

Con v, igual al perfil de velocidad para la región anular.

En la membrana:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -v \frac{\partial S}{\partial z} + D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial S}{\partial r} + \frac{\partial^2 S}{\partial r^2} + \frac{\partial^2 S}{\partial z^2} \right] + r_s \dots \dots \dots (5.26)$$

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -v \frac{\partial P}{\partial z} + D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial P}{\partial r} + \frac{\partial^2 P}{\partial r^2} + \frac{\partial^2 P}{\partial z^2} \right] + r_p \dots \dots \dots (5.27)$$

En la región central: Gobiernan las mismas ecuaciones diferenciales que las de la región central, pero con v igual al perfil de velocidades parabólico.

5.5.3 Algoritmo computacional para el biorreactor de membrana

Las ecuaciones anteriores, para los perfiles de velocidad se formulan para su graficación, obteniéndose el siguiente programa en Matlab:

```
function mbrenzymatic
clear all; close all;clc;
dr=.01;%distancia radial entre nodos
nr1=20;%número de nodos radiales en la región central, donde fluye el permeado
```

```

nr2=10;%número de nodos radiales en la membrana
nr3=20;%número de nodos radiales en la región anular del biorreactor
nrt=nr1+nr2+nr3;% número de nodos radiales totales
r1=(nr1-1)*dr;%radio interior de la membrana
r2=(nr2)*dr;%radio exterior de la membrana
r3=(nr3)*dr;%radio interior de la carcasa del reactor
b=r1+r2;c=r1+r2+r3;%parámetros para simplificar escritura de instrucciones
runo(1:nr1)=((1:nr1)-1)*dr;%parámetros para simplificar escritura de instrucciones
vmx=1;%velocidad máxima
vper(1:nr1)=0;%velocidad de permeado
rtres(1:nrt)=dr*((1:nrt)-1);%radio de la carcasa del reactor
vanul(1:nr3)=0;%dimensionamiento de matriz de velocidad anular
S0=1e-3;%concentración de entrada del sustrato
S(1:nr3)=0;%vector de concentración de sustrato
S(nr2+1:nr3)=S0;%condición inicial
% perfil parabólico
for i=1:nr1%ciclo para el cálculo del perfil parabólico de velocidad del permeado
vper(i)=vmx/2*(1-(runo(i)/r1)^2);
end
plot (runo,vper,'-');hold on;%desplegado gráfico del perfil de velocidad
% perfil de velocidades para la región anular
for i=nr1+nr2+1:nrt%ciclo para el cálculo del perfil de velocidad en la región anular
t1=8*vmx*(rtres(i)^2-b^2);%término uno del perfil de velocidades
t2=8*vmx*(b^2-c^2)*log(rtres(i)/b)/log(b/c);%término dos
vanul(i)=-t1+t2;%velocidad en la región anular
end
plot (rtres,vanul,'-r');hold on;grid on% desplegado gráfico

```

Los resultados de la ejecución de este algoritmo se presentan en la siguiente figura:

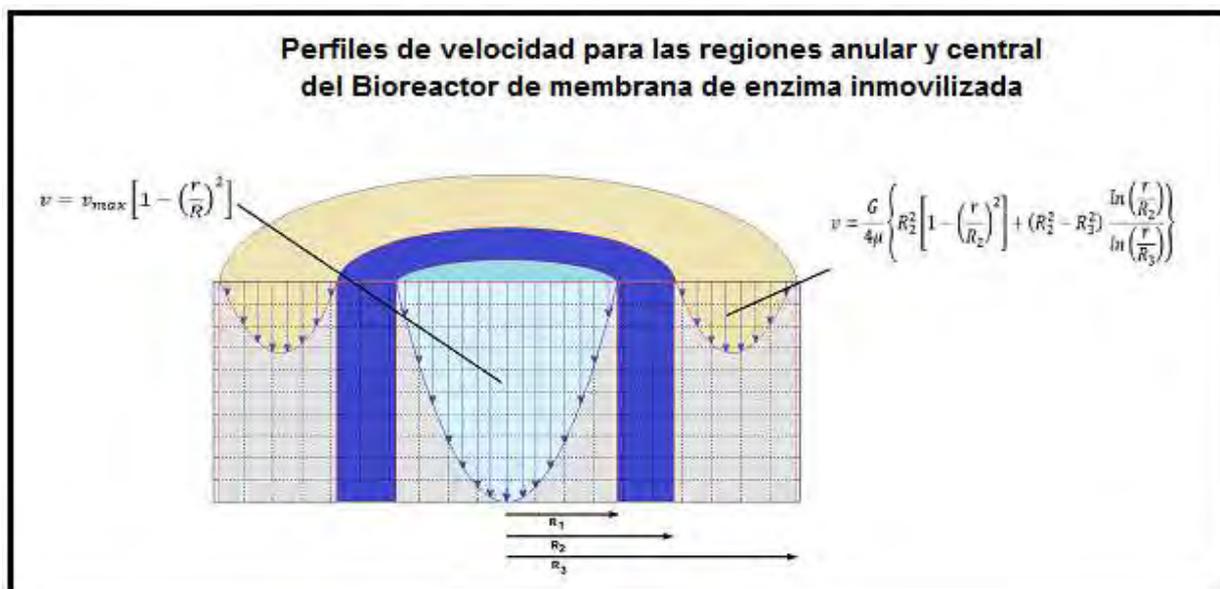


Figura 5.9 Perfiles de velocidad para las regiones anular y central del Biorreactor de membrana de enzima inmovilizada.

El modelo matemático para este tipo de biorreactor debe considerar la dinámica de fluidos con la ecuación de Navier-Stokes y los procesos de transferencia de masa con reacción bioquímica, mediante ecuaciones de reacción-difusión-convección, de cada una de las especies participantes de acuerdo al modelo cinético de Garhyan y Elnashaie^[2] para la fermentación de glucosa con *Zymomonas mobilis*. Las ecuaciones diferenciales gobernantes se discretizan mediante el esquema de Diferencias finitas explícitas, cuyo código en Matlab es el siguiente:

```
function mbrsym
clear all; close all;clc;
dr=.01;% espaciamiento entre nodos radiales
dz=.01;% espaciamiento entre nodos axiales
nr1=20;% número de nodos radiales en el tubo central (permeado)
nr2=10;% número de nodos radiales en el grosor de la membrana
nr3=19;% número de nodos radiales en la región anular
nrt=nr1+nr2+nr3;% número total de nodos radiales
nz=100;% número de nodos axiales
dt=.01;nit=750;% paso de tiempo y número total de intervalos de tiempo
r1=(nr1-1)*dr;% magnitud del radio de la superficie interior de la membrana
r2=(nr2)*dr;% magnitud del radio hasta la superficie exterior de la membrana
r3=(nr3)*dr;%magnitud del radio de la coraza del reactor
b=r1+r2;% suma de los radios r1 y r2, para cálculos
c=r1+r2+r3;% suma de los radios r1 , r2 y r3 para cálculos
r(1:nrt)=0;% dimensionamiento de la matriz de coordenadas radiales
for i=1:nrt;r(i)=(i-1)*dr;end% ciclo para especificación de coordenadas radiales
runo(1:nr1)=((1:nr1)-1)*dr;% ciclo para coordenadas radiales en región uno
vmx=.1;vper(1:nr1)=0;% velocidad máxima en región central
rtres(1:nrt)=dr*((1:nrt)-1);% ciclo para coordenadas radiales en región anular
vanul(1:nr3)=0;% matriz para cálculos de velocidad en la región anular
S0=120;% concentración de sustrato en la alimentación al reactor
Ds=1e-5;% coeficiente de difusión del sustrato en fase líquida
S(1:nrt,1:nz)=120;% concentración inicial de sustrato en la región anular
S(nr2+1:nrt,2:nz-1)=S0;% concentración inicial de sustrato dentro de la membrana
P(1:nrt,1:nz)=50;% concentración inicial de producto dentro de la membrana
X(1:nrt,1:nz)=7;% concentración inicial de microorganismos dentro de la membrana
E(1:nrt,1:nz)=0.00001;% concentración de enzima dentro de la membrana
% cálculo del perfil parabólico en la región central
for i=1:nr1
    vper(i)=vmx/2*(1-(runo(i)/r1)^2);%perfil obtenido analíticamente
end
plot (runo,vper,'-');hold on;
% cálculo del perfil de velocidades para la región anular
for i=nr1+nr2+1:nrt
% variables auxiliares (t1 y t2) para el desplegado gráfico de la velocidad
t1=8*vmx*(rtres(i)^2-b^2);
t2=8*vmx*(b^2-c^2)*log(rtres(i)/b)/log(b/c);
```

```

vanul(i)=-t1+t2;%perfil obtenido analíticamente
end
plot (rtres,vanul,'-r');hold on;grid on
%parámetros cinéticos
mumax=1;% coeficiente mumax para el crecimiento microbiano
Ysx=2.44498e-2;% coeficiente estequiométrico sustrato-microorganismos
Ypx=5.26315e-2;% coeficiente estequiométrico producto-microorganismos
ms=2.16;mp=1.1;% coeficientes de equivalencia másica para sustrato-producto
k1=16;k2=0.497;% coeficientes cinéticos para la reacción microbiana
k3=3.83e-3;ks=.5;% coeficientes cinéticos para la reacción microbiana
z(1:nz)=0;% dimensionamiento de matriz de coordenadas axiales
for j=1:nz;z(j)=(j-1)*dz;end% especificación de coordenadas axiales
for t=1:nit% inicio de cálculos iterativos
% Cálculo de la concentración de sustrato para la región anular
for i= nr1+nr2+1:nrt-1% cálculos para la región anular
for j=2:nz-1 % barrido sobre los nodos axiales
convz=vanul(i)*(S(i,j)-S(i,j-1));% término convectivo
% terminus difusivos
lapr=(S(i+1,j)-2*S(i,j)+S(i-1,j))/dr^2+1/r(i)*(S(i,j)-S(i-1,j))/dr;
lapz=(S(i,j+1)-2*S(i,j)+S(i,j-1))/dz^2;
% evolución de concentración de sustrato
S(i,j)=S(i,j)+dt*(convz+Ds*lapr+Ds*lapz);
X(i,j)=0;E(i,j)=0;% concentración de microorganismos y enzima
end
end
% cálculo de la concentración de sustrato en la membrana
for i=nr1:nr1+nr2
for j=2:nz-1
% términos difusivos
lapr=(S(i+1,j)-2*S(i,j)+S(i-1,j))/dr^2+1/r(i)*(S(i,j)-S(i-1,j))/dr;
lapz=(S(i,j+1)-2*S(i,j)+S(i,j-1))/dz^2;
lapPr=(P(i+1,j)-2*P(i,j)+P(i-1,j))/dr^2+1/r(i)*(P(i,j)-P(i-1,j))/dr;
lapPz=(P(i,j+1)-2*P(i,j)+P(i,j-1))/dz^2;
% cálculo de mu a partir del modelo de Monod
mu=mumax*S(i,j)/(ks+S(i,j))*E(i,j)/X(i,j);
Rs=(1/Ysx*mu+ms)*X(i,j);% velocidad de consumo sustrato
Rp=(1/Ypx*mu+mp)*X(i,j);% velocidad de producción de producto
Rx=mu*X(i,j);% velocidad de crecimiento microbiano
Re=(k1-k2*P(i,j)+k3*P(i,j)^2)*mu*X(i,j); % velocidad de consume de enzima
S(i,j)=S(i,j)+dt*(Ds*(lapr+lapz)-Rs);%evolución de la concentración de sustrato
P(i,j)=P(i,j)+dt*(Ds*(lapPr+lapPz)+Rp);% evolución concentración de producto
X(i,j)=X(i,j)+dt*(Rx);% evolución de la concentración de productos
E(i,j)=E(i,j)+dt*(Re);% evolución de la concentración de la enzima
end
end
% Cálculo de la concentración de sustrato para la región central
for i=2:nr1-1
for j=2:nz-1
convz=vper(i)*(S(i,j)-S(i,j-1));% término convectivo para el sustrato
% términos difusivos

```

```

    lapr=(S(i+1,j)-2*S(i,j)+S(i-1,j))/dr^2+1/r(i)*(S(i,j)-S(i-1,j))/dr;
    lapz=(S(i,j+1)-2*S(i,j)+S(i,j-1))/dz^2;
% evolución de la concentración de sustrato
S(i,j)=S(i,j)+dt*(convz+Ds*lapr+Ds*lapz);
convzP=vper(i)*(P(i,j)-P(i,j-1));% término convectivo para el producto
% término difusivos para el producto
laprP=(P(i+1,j)-2*P(i,j)+P(i-1,j))/dr^2+1/r(i)*(P(i,j)-P(i-1,j))/dr;
lapzP=(P(i,j+1)-2*P(i,j)+P(i,j-1))/dz^2;
% evolución de la concentración del producto
P(i,j)=P(i,j)+dt*(convzP+100*Ds*laprP+Ds*lapzP);
X(i,j)=0;E(i,j)=0;% concentración de microorganismos y enzima en región anular
% cálculo de concentración de sustrato y product en la región anular
S(nr1-1,1:nz)=S(nr1,1:nz);
P(nr1-1,1:nz)=P(nr1,1:nz);
end
end
%condiciones de frontera
S(nrt,1:nz)=S(nrt-1,1:nz);% frontera no difusiva en la pared interior de la coraza
S(nr1+nr2+1:nrt,nz)=S(nr1+nr2+1:nrt,nz-1);%frontera no difusiva en pared inferior
S(nr1+1:nr2,1)=S(nr1+1:nr2,2);% frontera no difusiva en pared superior
S(nr1+1:nr2,nz)=S(nr1+1:nr2,nz-1);% front no difusiva en pared infer de membrana
S(1:nr1,1)=S(1:nr1,2); % frontera no difusiva en pared superior de membrana
S(1:nr1,nz)=S(1:nr1,nz-1);% frontera no difusiva en pared inferior de región central
S(1,1:nz)=S(2,1:nz);% frontera no difusiva en pared superior de región central
S(nr1-1,1:nz)=S(nr1,1:nz);% frontera no difusiva en pared exterior de la reg central
P(nr1-1,1:nz)=P(nr1,1:nz);% frontera no difusiva en pared exterior de la reg central
P(nr1+1:nr2,1)=P(nr1+1:nr2,2);% front no difusiv en pared superior de membrana
P(nr1+1:nr2,nz)=P(nr1+1:nr2,nz-1); % front no difusiv en pared infr de membrana
P(1:nr1,1)=P(1:nr1,2);% frontera no difusiva en pared superior de región central
P(1:nr1,nz)=P(1:nr1,nz-1); % salida de prod en último nodo igual a la del penúltimo
P(1,1:nz)=P(2,1:nz); % frontera no difusiva pared de coraza
contar =t/10;% desplegado gráfico
if((contar-ceil(contar))==0)
figure (1)
    subplot (2,2,1);contourf(z,r,S);colorbar;
    title(['tiempo=' num2str(t*dt)]);
    subplot (2,2,2);contourf(P);colorbar;
    subplot (2,2,3);contourf(X);colorbar;
    subplot (2,2,4); contourf(E);colorbar;
figure (2)
else
end
end
end

```

5.5.4 Resultados para el reactor de membrana:

El algoritmo de cómputo permite obtener la evolución de los perfiles de concentración de las diferentes especies en el biorreactor de membrana. El desplegado gráfico se hace por intervalos de tiempo. En seguida se presenta solamente los perfiles de concentración después de siete horas y media de operación (figura 5.10). Por otra parte la evolución de los perfiles de concentración en las corrientes de salida de sustrato y producto se reportan en la figura 5.11.

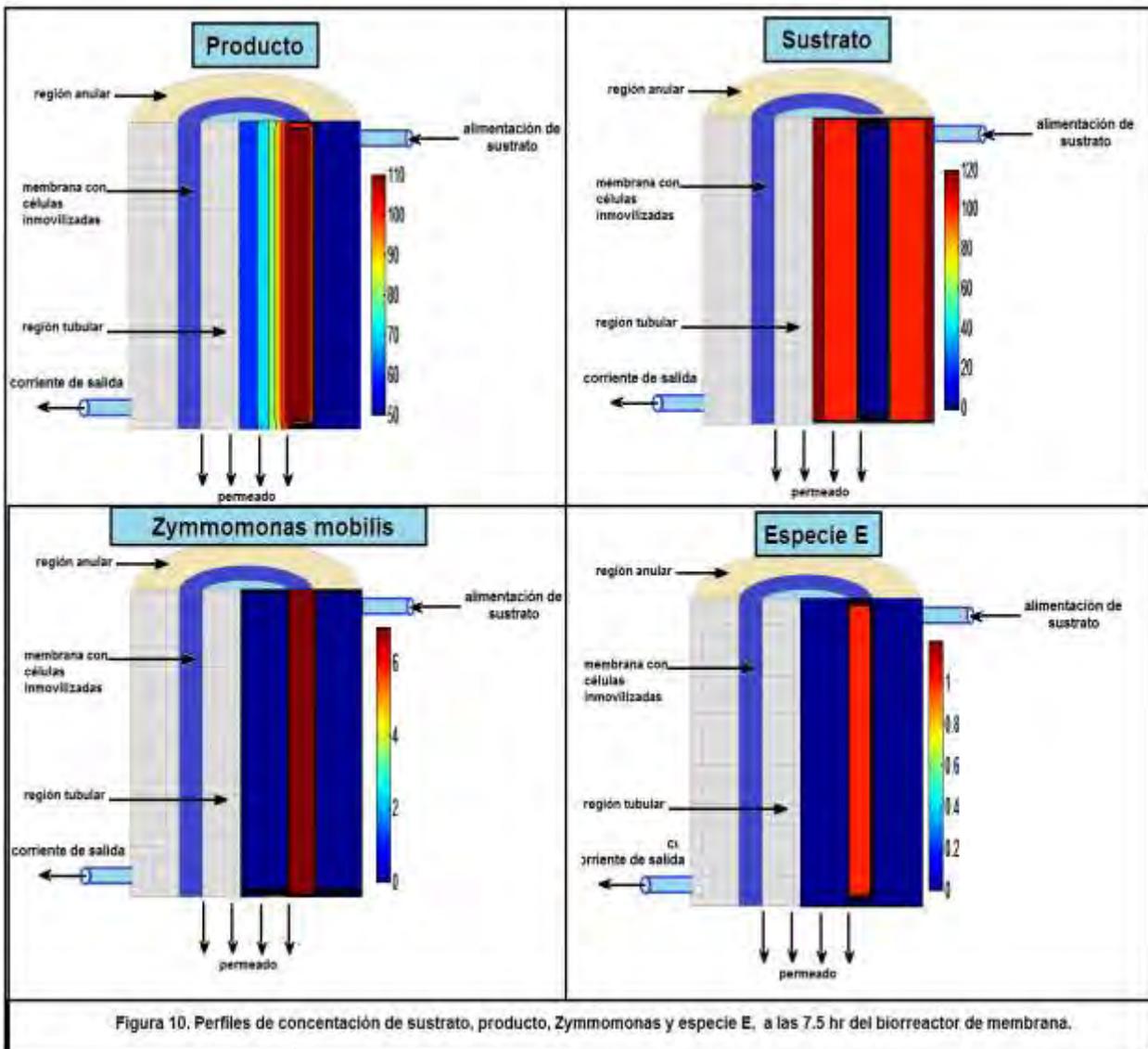


Figura 5.10. Perfiles de concentración de sustrato, producto, microorganismos y enzima E después de 7 hrs, de operación del biorreactor de membrana de células inmovilizadas. Concentración de sustrato en la entrada =120 gr/litro; de producto =50 gramos/litro, de Zymomonas =7 gr/litro y de especie E=1 x 10⁻⁵.

De la simulación de este tipo de biorreactor se encontró que la carga de microorganismos puede ser más baja que en un reactor de flujo continuo de tanque agitado (CSTR). Se probó con una concentración inicial de microorganismos de 0.7 gramos/litro. Los resultados se muestran a continuación:

Obsérvese en la figura 5.11, la evolución del perfil de concentraciones dentro del reactor; mientras que la figura 5.12 muestra la evolución de la concentración de cada una de las especies a la salida del biorreactor.

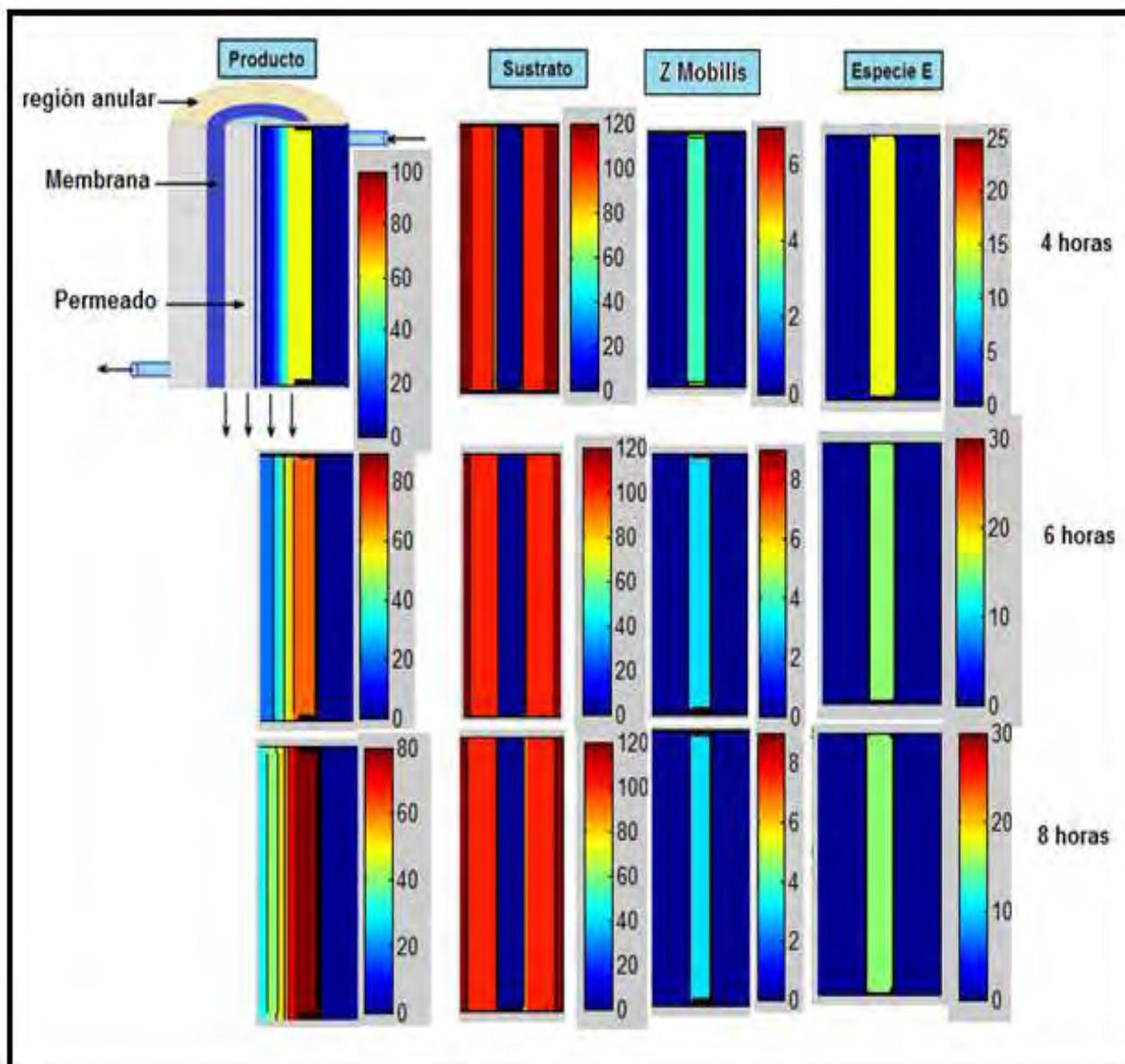


Figura 5.11. Evolución de los perfiles de concentración de cada una de las especies dentro del biorreactor de membrana

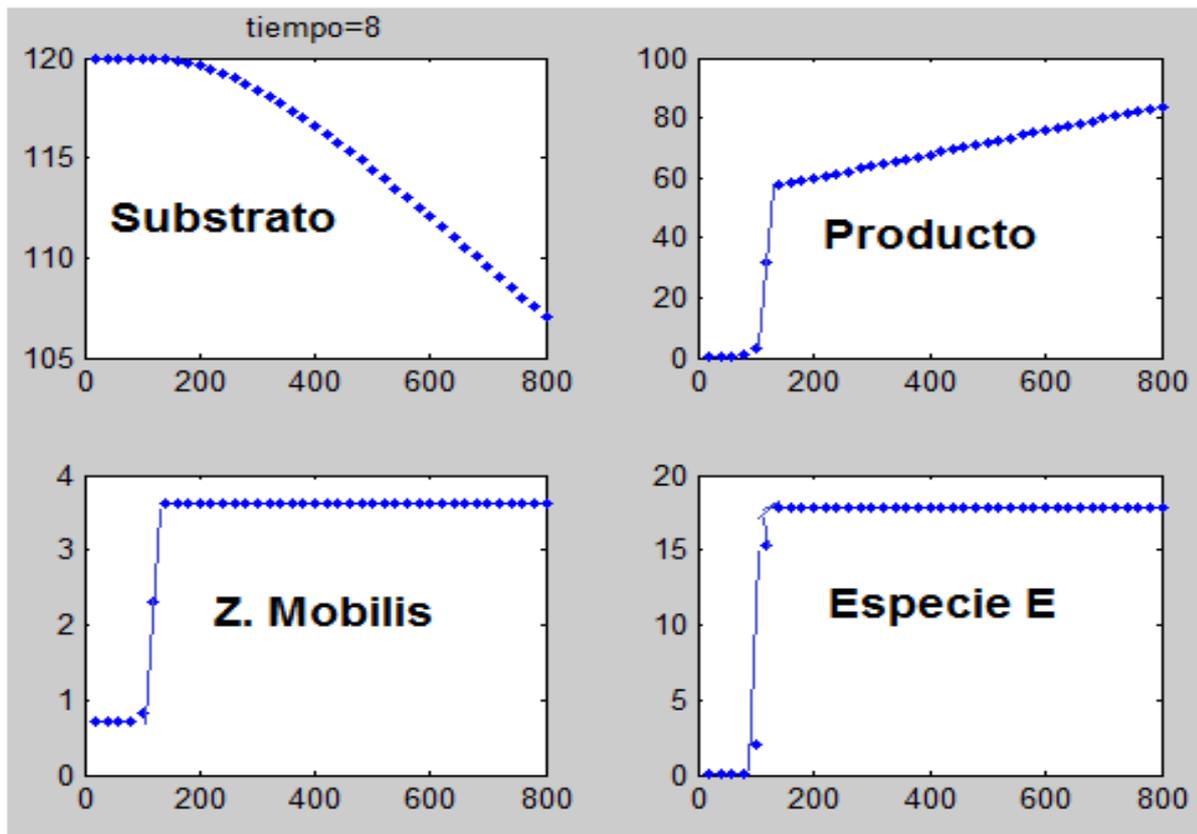


Figura 5.12. Evolución de la concentración de cada una de las especies a la salida del reactor

Mientras el consumo de sustrato sigue una tendencia monótona, las concentraciones de las demás especies exhiben un salto a los 100 segundos que se puede observar en las gráficas. Este comportamiento difiere bastante con las oscilaciones que se presentan en el reactor CSTR, es decir las oscilaciones desaparecen cuando el procesamiento es en un biorreactor de membrana, lo cual también ocurre con reactores de flujo de pistón. La dinámica de los reactores CSTR frecuentemente da lugar a oscilaciones, prestándose la situación para diseñar un controlador que permita maximizar la producción.

En resumen, en este capítulo se escribió un algoritmo de cómputo para la dinámica del biorreactor CSTR, el cual fue utilizado para calcular la evolución de las concentraciones de las diferentes especies y optimizar las condiciones de operación para maximizar el rendimiento del producto.

Se formuló un segundo algoritmo computacional para describir la operación de un biorreactor de membrana de células inmobilizadas, en el cual se llevan a cabo simultáneamente dos operaciones unitarias, la reacción microbiana y la separación de los productos. La utilización de este algoritmo permitiría optimizar las condiciones de operación.

Nomenclatura:

C_E = Concentración de la especie E, g/lit

C_{Ef} = Concentración de la especie E en la alimentación, g/lit

C_S = Concentración de sustrato (glucosa), g/lit

C_{Sf} = Concentración de sustrato en la alimentación, g/lit

C_P = Concentración del producto (etanol) , g/lit

C_{Pf} = Concentración de producto en la alimentación, g/lit

C_X = Concentración de microorganismos (Zymomonas Mobilis) , g/lit

C_{Xf} = Concentración de microorganismos en la alimentación, g/lit

D = rapidez de dilución, recíproco del tiempo de residencia, seg^{-1}

K_1, K_2, K_3 = constantes del modelo cinético

K_S = Coeficiente cinético Michaeliana del modelo de Monod

m_S = rapidez de consumo del sustrato

m_P = rapidez de producción del producto

R_E = Rapidez de crecimiento de la población de la especie E

R_P = rapidez de producción del producto

R_S = rapidez de consumo de sustrato

R_X = rapidez de crecimiento de la población de Zymomonas

Y_{PX} = Coeficiente estequiométrico para conversión a producto o a microorganismos

Y_{SX} = Coeficiente estequiométrico para conversión de sustrato a microorganismos

Símbolos Griegos:

μ = rapidez de conversión del modelo de Monod

μ_{\max} = rapidez máxima de conversión en el modelo de Monod

Bibliografía

[1] Paz Astudillo, Isabel Cristina **(2010)**. Tesis Doctoral: “Diseño Integral de Biorreactores Continuos de Tanque Agitado Aplicado a Procesos de Fermentación”. Universidad de Colombia, Sede Manizales.

[2] Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. **(2005)** Experimental Investigation and Confirmation of Static/Dynamic Bifurcation Behavior in a Continuous Ethanol Fermentor. Ind. and Eng. Chemical Research 44:2525-2531.

[3] Mokomele, Thapelo; Callanan Linda H.; Clarke, Kim G. **(2012)** Ethanol production from xilose and glucose by zymomonas mobilis for the development of a membrane bioreactor. P H D. Thesis. University of Stellenbosch

[3] Sridhar, Lakshmi N. (2013). Global Optimization of Continuous Fermentation Involving Zymomonas mobilis. Journal of Sustainable Bioenergy Systems. 3: 64-67. Utilizan herramientas de Matlab, de optimización por gradiente, para optimizar la operación de fermentadores CSTR en estado estacionario, utilizando la cinética de Garhyan y Elnashaie.

Conclusiones

La Ingeniería de Biorreactores es un área que se encuentra en desarrollo actualmente en todos los países del mundo. Algunos de los desarrollos biotecnológicos han sido propuestos y materializados en América Latina. No es difícil encontrar en la literatura científica, trabajos empíricos y teóricos desarrollados en universidades de Colombia, Brasil y México, entre otros.

La mayoría de los artículos que se pueden encontrar en revistas biotecnológicas tienen que ver con la propuesta de una nueva materia prima para biodiesel, o clarificación de jugos o vinos, o para procesos de fermentación. En esos artículos, el investigador se dedica a recolectar datos de laboratorio y proponer ajustes funcionales a algún modelo cinético, ya sea enzimático o microbiano. Esa tarea es muy laboriosa y muy apreciada dentro de la comunidad científica.

Después de obtener los datos cinéticos, el investigador puede proponer procesos industriales en los que se utilicen tipos de reactores clásicos como el tipo batch, o el CSTR o el PFR, o algún prototipo novedoso recientemente patentado o de su propia invención. Y entonces comúnmente se presentan resistencias a los procesos de difusión, adsorción y de hidrodinámica compleja. El ingeniero puede optar por realizar escalamientos basados en grupos adimensionales, para lo cual se requiere de un buen diseño de experimentos para minimizar el número de corridas, la materia prima y el propio tiempo de experimentación. Esta es ingeniería de principios del siglo XX.

Otra opción consiste en modelar matemáticamente los fenómenos involucrados, Para lo cual el ingeniero debe tener buen conocimiento de los fenómenos de transporte, la dinámica de fluidos, los fenómenos de superficie, etc. Una vez formulado el modelo matemático, comúnmente basado en ecuaciones diferenciales parciales espacio-temporales acopladas no lineales, ahora el problema es el de la resolución de ese sistema de ecuaciones.

Para resolver las ecuaciones diferenciales mencionadas en el párrafo anterior se cuenta con métodos analíticos, pero son aplicables a casos muy ideales, por lo que comúnmente se recurre a métodos numéricos. Los métodos numéricos que se pueden utilizar son los de diferencias finitas (siglo XVII), elementos finitos (principios del siglo XX) , pero tienen inconvenientes.

El método de diferencias finitas es fácil de programar, pero es impreciso y poco flexible; su leve fundamento basado en el teorema de L'Hopital no le brinda alta precisión, y cuando se cambia la geometría del dominio de la solución de las ecuaciones diferenciales, normalmente es necesario volver a programar. El de elementos finitos es muy exacto y flexible, pero como se trata de un método implícito, en cada paso de tiempo hay que resolver un sistemas de ecuaciones algebraicas simultáneas acopladas no lineales, lo cual suele tomar mucho tiempo. Es muy flexible en el sentido de que es muy fácil modificar la geometría del dominio de la solución y las condiciones de frontera.

Sin embargo el método que conjunta la facilidad de su programación, alta exactitud y rapidez de ejecución, es el de autómatas celulares en redes de Boltzmann, que es una de las aportaciones más importantes de esta tesis.

e formularon algoritmos propios para los métodos de diferencias finitas, Euler, Runge-Kutta y retículas de Boltzmann, a pesar de que seguramente ya existe software comercial para los tres primeros.

En cuanto a las redes de Boltzmann, es tan reciente (diciembre de 2016) que aún no existe software comercial, aunque seguramente no tardará alguna compañía en lanzarlo al mercado.

Las aplicaciones del método de retículas de Boltzmann no se cierran a procesos biotecnológicos, si no que se puede implementar para resolver problemas de ingeniería biomédica, transferencia de calor, dinámica de flujos complejos, e incluso para resolver la ecuación de Schrödinger de la mecánica cuántica.

Varios problemas abordados en esta tesis, pueden desarrollarse en mayor profundidad, pero se prefirió tener un texto en el que se pudieran encontrar modelos matemáticos y algoritmos computacionales para todo tipo de cinética enzimática y microbiana, así como para el diseño de varios tipos de reactores.

Bibliografía

Capítulo 1

- [1] Nelson, David L, Cox, Michael M. (2015). Lehninger, Principios de Bioquímica. Madrid, Edit. Omega.
- [2] Aehle, Wolfgang. (2004). Enzymes in Industry, Production and Applications. 2nd edition. Wiley VCH
- [3] Guisan, José M., (2006). Immobilization of enzymes and cells, 2nd edition. Humana Press.
- [4] Zhang, C; Xing, X. H. (2011). Comprehensive Biotechnology Enzyme Bioreactors. Elsevier.
- [5] Williams, J. A. (2002). Keys to bioreactor selections. Chemical Engineering Progress 98: 34-41.
- [6] Kadic, Enes; Heindel, Theodore. (2014). An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer. New Jersey. Wiley.
- [7] Hickey, A.M. et al (2007). Immobilization of thermophilic enzymes in miniaturized flow reactors
- [8] Bódalo, A, et al. (1995). Fluidized bed reactors operating with immobilized enzyme systems. Enzyme and Microbial Technology. 17: 915-922.

Capítulo 2

- [1] Herbert, Sauro (2011). Enzyme Kinetics for Systems Biology. Ambrosius Publishing.
- [2] Doran, Pauline.(2013) Bioprocess Engineering, 2nd edition. Academic Press. Elsevier
- [3] Villadsen, John; Nielsen, Jens; Lidén, Gunnar. (2013) Bioreaction Engineering Principles, Third Edition. Springer.
- [4] Botts, J.; Morales, M. (1953). Transactions of Faraday Society. 49: 696-707
- [5] Hammes, Gordon G. and Wu, Cheng Weng. (1974) Kinetics of Allosteric Enzymes. Annu. Rev. of Biophys and Bioeng. 3: 1-33.

Capítulo 3

[1] Aiba, S.; Humphrey, A. E.; Millis, N. F. (1973). Biochemical Engineering, 2nd edition. Academic Press.

[2] Fogler, H. Scott (2011). Essentials of Chemical Reaction Engineering. Prentice Hall.

[3] Villadsen, John; Nielsen, Jens; Lidén, Gunnar. (2013) Bioreaction Engineering Principles, Third Edition. Springer.

[4] Doran, Pauline.(2013) Bioprocess Engineering, 2nd edition. Academic Press. Elsevier

Capítulo 4

Cabral, Joaquim M.S.(2001). Multiphase Bioreactor Design. Taylor and Francis, London.

Lim, Henry C. and Shin,Hwa Sung. (2013), Fed-Batch Cultures, Principles and applications of semi-batch bioreactors. New York

Zheng, Yiszhou; Gu, Tingyue. (1997). Analytical Solution to a Model for the Startup Period of Fixed-Bed Reactors. Chemical Engineering Science, Vol. 15, No. 5, 3773-3779.

Glasgow, Larry A. (2011). Transport Phenomena, an introduction to advanced topics. Wiley

Bird, R. B.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. (2002). Transport Phenomena. 2nd Edition. Wiley

Capítulo 5

[1] Paz Astudillo, Isabel Cristina **(2010)**. Tesis Doctoral: “Diseño Integral de Biorreactores Continuos de Tanque Agitado Aplicado a Procesos de Fermentación”. Universidad de Colombia, Sede Manizales.

[2] Garhyan P., Elnashaie S.S.E.H. **(2005)** Experimental Investigation and Confirmation of Static/Dynamic Bifurcation Behavior in a Continuous Ethanol Fermentor. Ind. and Eng. Chemical Research 44:2525-2531.

[3] Mokomele, Thapelo; Callanan Linda H.; Clarke, Kim G.**(2012)** Ethanolproduction from xilose and glucose by zymmomonas mobilis for the development of a membrane bioreactor. P H D. Thesis. University of Stellenbosch.