

Señor
JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S.D.

EXPEDIENTE No. 03.113.179.

ASUNTO: Solicitud de Patente de Invención denominada SISTEMA
COMPACTO PARA FERMENTACIONES AEROBICAS Y
EQUIPAMIENTO DE PROCESO.

Solicitante: BIOFORRAJES S.A.

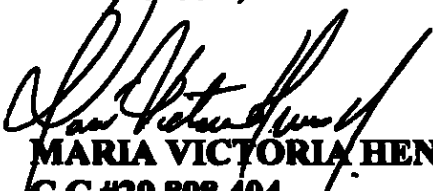
TASAS EXAMEN DE PATENTABILIDAD

MARIA VICTORIA HENAO HERNÁNDEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 29.808.404 de Sevilla, Valle, abogada en ejercicio con Tarjeta Profesional No. 22.057 del C.S.J., obrando como apoderada de la sociedad BIOFORRAJES S.A., por medio del presente memorial me permito anexar lo siguiente:

- 1) El recibo No. 39497638 del Banco Popular de Tasas Oficiales por valor de TRESCIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS (\$371.000) MCTE, para el examen de patentabilidad de la Patente de de la referencia.

Por lo anterior, solicito muy amablemente se ordene el examen de patentabilidad de la patente de la referencia y para lo cual se me puede notificar en la CALLE 94 A #11 A-39 OFC. 403, TEL.091-6216181, BOGOTÁ,D.C.–Email. henaohernandez@telesat.com.co.

Del señor Jefe,


MARIA VICTORIA HENAO
C.C.#29.808.404
T.P. 22.057 DEL C.S.J.

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

38
1
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 0611479 00000001 Folios: 2
Fecha (AND): 2005-10-10 16:05:45
Tramite : 002 PATENTES D / REGISTRO/ 536 PETICION
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 78.478
FECHA : OCTUBRE 10 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BIOFORRAJES S.A.	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	39497638	30/08/2005	371,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	85 EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE INVEN	371,000.00
TOTAL :			\$ 371,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. 03-113179

**EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No 553, DE
FECHA 30 DE JUNIO DE 2005, EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY
EXPIRA EL 27 DE SEPTIEMBRE DE 2005.**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI

NO X

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D. C., 7 de Julio de 2006

Doctora
MARÍA VICTORIA HENAO
Representante **BIOFORRAJES S. A.**

ASUNTO	Radicación No.	03- 113179	07392
	Trámite	002	
	Evento	001	
	Actuación	430	
	Oficio		
	Folios	024	

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica

1) Documentos estudiados:

- a) Para el presente estudio se tendrán en cuenta el capítulo descriptivo, comprendido en los folios 6 a 13 de la solicitud en estudio.
- b) Para el presente estudio se tendrán en cuenta los dibujos comprendidos en los folios 3 a 5 de la solicitud en estudio.
- c) Para el presente estudio se tendrá en cuenta el capítulo reivindicatorio que comprende 11 reivindicaciones en los folios 14 a 15 de la solicitud en estudio.
- d) Conforme lo establece los artículos 9, 10 y 11 de la decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, la presente solicitud en estudio fue presentada el 30 de diciembre de 2003, y en el momento de la radicación **NO** se reclamo prioridad alguna.

2) Objeto de la Invención

- a) Las reivindicaciones 1 a 11 de la solicitud en estudio se refieren a:

- i) (1.-) Sistema de fermentación aeróbica de tipo batch o continua para producir biomasa a partir de microorganismos aeróbicos o anaerobios facultativos a partir de un proceso caracterizado por un montaje de equipos que incluyen preferiblemente: un tanque de recirculación, fermentación o alimentación, un inyector de aire hidráulico y un reactor tubular.
 - ii) 2.- Sistema de fermentación conforme a la reivindicación 1 caracterizado además en que el montaje de equipos no requiere una fuente de energía para el suministro de oxígeno y aire para la fermentación (compresor) lo cual se suple a través de un inyector de aire.
 - iii) 3.- Sistema de fermentación conforme a la reivindicación 1 en donde el proceso de fermentación incluye los siguientes pasos: - alimentar semilla, nutrientes sólidos y líquidos al sistema en un tanque de alimentación o fermentador - bombear la mezcla hacia el dispositivo inyector - inyectar aire al sistema en el inyector - descargar la mezcla de fermentación en un reactor tubular para poner en contacto el mosto y el aire insuflado por el inyector - descargar la mezcla dentro del tanque de recirculación o fermentador - separación de líquido y gases residuales en dicho tanque.
 - iv) 4.- Sistema según la reivindicación 1 y 3 en donde el tanque fermentador es un recipiente cilíndrico, con un sistema interior para eyección de la mezcla de gases y mosto.
- b) El anterior "sistema" busca mejorar la forma de producir biomasa.
- c) Según la Clasificación Internacional de Patentes, la codificación para esta solicitud corresponde a C 12 P 1/00

3) Claridad de la Solicitud

- a) El artículo 28 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones establece

"La descripción deberá divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla"

La descripción no es clara toda vez que es al parecer quién elaboró la solicitud desconoce los conceptos básicos del sistema de patentes.

En primer lugar, el solicitante coloca que "el presente invento se refiere a un proceso para producir biomasa", pero en las reivindicaciones se refiere a un "sistema de fermentación" Una cosa es un proceso con una secuencia de etapas lógicamente encadenadas para buscar un fin y otra una configuración de equipos o elementos (sistema) para desarrollar un proceso. Son dos cosas totalmente diferentes.

En segundo lugar, el solicitante afirma que lo novedoso de su solicitud es un inyector de aire. Esto lo afirma en el folio 6 y lo reafirma en los folios 7 y 8. Sin embargo, esta no es la idea que desarrolla en su solicitud. En el folio 11 habla nuevamente que el elemento esencial de la solicitud es un inyector y lo describe en solo un párrafo. Entonces la solicitud debería

quedar reducida prácticamente a este párrafo. El resto de la descripción de la solicitud relaciona etapas del proceso y nombra algunos equipos **SIN DETALLE ALGUNO y afirmando que se trata de equipos convencionales.** Por tanto, no deberían ser parte de la solicitud.

En general, la presente solicitud además, de no tener claro el objeto de la solicitud, no cumple con los requisitos establecidos por la legislación para la presentación de solicitudes de patente y es etérea. El solicitante debe recordar que la legislación exige:

"Artículo 28.- La descripción deberá divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla. La descripción de la invención indicará el nombre de la invención e incluirá la siguiente información:"

"a) el sector tecnológico al que se refiere o al cual se aplica la invención;"

"b) la tecnología anterior conocida por el solicitante que fuese útil para la comprensión y el examen de la invención, y las referencias a los documentos y publicaciones anteriores relativas a dicha tecnología;"

"c) una descripción de la invención en términos que permitan la comprensión del problema técnico y de la solución aportada por la invención, exponiendo las diferencias y eventuales ventajas con respecto a la tecnología anterior;"

"d) una reseña sobre los dibujos, cuando los hubiera;"

"e) una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos, de ser éstos pertinentes; y,"

"f) una indicación de la manera en que la invención satisface la condición de ser susceptible de aplicación industrial, si ello no fuese evidente de la descripción o de la naturaleza de la invención."

En primer lugar el solicitante debe tener claro que es lo que considera como nuevo. Esto es lo que será el objetivo de invención. Si lo nuevo es el inyector, deberá enfocar claramente la solicitud en este sentido. Si lo nuevo es una configuración de equipos o elementos, su solicitud será un sistema. Si lo nuevo son las etapas de un proceso, pues deberá enfocar su solicitud hacia allá. El título deberá enfocarse hacia allá también.

En segundo lugar, deberá desarrollar su descripción de forma tan clara y completa que un experto pueda reproducir su solicitud. Debe recordar que **debe ser clara y completa.**

En tercer lugar deberá enfocar claramente el sector tecnológico al que se refiere o al cual se aplica la invención. Es decir, si lo nuevo es el inyector, entonces explicar que se trata de un elemento para introducir aire, en especial a reactores y más especialmente a reactores con biomasa, y desarrollar la idea. Si lo nuevo son configuraciones de elementos (plural) para producir biomasa, ser explícitos en ello. Lo mismo si se trata de un proceso

En tercer lugar ser explícitos en definir la tecnología anterior conocida por el solicitante que fuese útil para la comprensión y el examen de la invención, y las referencias a los documentos y publicaciones anteriores relativas a dicha tecnología. Pero debe tenerse muy claro que es lo que el solicitante considera como nuevo.

En cuarto lugar debe desarrollarse la descripción de la invención en términos que permitan la comprensión del problema técnico y de la solución aportada por la invención, exponiendo las diferencias y eventuales ventajas con respecto a la tecnología anterior; Debe tenerse muy claro cual es la tecnología considerada nueva y aportada por el solicitante.

En quinto lugar, debe suministrarse una reseña sobre los dibujos, como si lo hizo el solicitante en este caso.

En sexto lugar el solicitante debe suministrar una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica lo que considera invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos. Pero debe tenerse claro lo que se considera nuevo. No es hablar de todo un poco. Es enfocarse directamente en lo que desea que se le proteja.

Además de lo anterior, el solicitante debe recordar que no se permiten el uso de palabras en idiomas diferentes al español (por ejemplo, *bach* no existe en español, la palabra inglesa 'batch' equivale a la palabra 'cochada' en español). Adicionalmente no puede "inventarse términos". La frase "inyectores hidráulicos" no define exactamente el elemento que muestra en la solicitud. El tipo de inyector que se exhibe en los dibujos tiene un nombre específico en el argot técnico.

En general, la solicitud se encuentra muy mal presentada. El solicitante deberá replantear su solicitud y anexar un nuevo documento que cumpla los lineamientos de la legislación.

- b) El artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que

"Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción. Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior.- Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará reivindicación dependiente múltiple."

El capítulo reivindicatorio no es claro toda vez que:

- i) No se encuentra correctamente redactado. Por su estructura todas las reivindicaciones deben constar de dos partes. Una primera parte, el preámbulo, sirve para situar el objeto de la invención dentro de un contexto técnico, es lo que se conoce y sobre lo que no se reclama

ningún privilegio. La segunda parte, o parte característica, define lo que se considera novedoso y se desea proteger. Estas dos partes están separadas por expresiones como 'caracterizado por' o similares. Debe revisarse todo el capítulo.

- ii) No pueden emplearse palabras en otros idiomas. "Bach" no existe en español.
- iii) La solicitud es ambigua. Nótese que el solicitante quiere que se le proteja un sistema de fermentación, pero dicho sistema consta "preferiblemente" de tres equipos. Es absurdo. El solicitante debe describir los equipos que constan lo que el considera como nuevos.
- iv) Las reivindicaciones no tienen sustento en la descripción. Si el solicitante considera que lo nuevo son los inyectores debería colocarlos en la reivindicación principal. Es absurdo a todas luces que coloque una reivindicación escondida (la número 7) donde afirme que el elemento esencial son los inyectores. Si es lo esencial debería ser la reivindicación principal.
- v) Presenta Incoherencias. En la reivindicación 3 habla que se va a proteger un sistema pero describe un proceso. O es un sistema o es un proceso, pero no se puede definir un sistema por un proceso ni viceversa.
- vi) No pueden aceptarse ambigüedades como "durante un tiempo". En las reivindicaciones se debe ser claro y conciso.
- vii) La reivindicación 11 es un uso, lo cual no es aceptado en la legislación colombiana. Debe eliminarse dicha reivindicación.
- viii) En general, las reivindicaciones se encuentran mal presentadas, toda vez que el solicitante no tiene claro el objeto de la protección.

De acuerdo a lo anterior, el capítulo reivindicatorio no cumple con el requisito de claridad de acuerdo a lo establecido en el Art. 30 de la Decisión 486. El solicitante deberá presentar un nuevo capítulo corrigiendo todos los defectos aquí enumerados.

4) Determinación del Estado de la Técnica y Evaluación de los requisitos de patentabilidad

Cuando el solicitante haya corregido el capítulo reivindicatorio y lo haya orientado de forma tal que sea claro lo que quiere le sea protegido, en ese momento esta oficina podrá elaborar una determinación correcta del estado de la técnica y una evaluación correcta de los requisitos de patentabilidad

Sin embargo, nótese que la solicitud se encuentra tan mal presentada que un libro de texto como el Manual del Ingeniero Químico de Perry revela lo que el solicitante desea que se le proteja. Nótese como por ejemplo cualquier sistema de fermentación, incorpora un tanque de recirculación, fermentación o alimentación, incorporan inyectores y reactores tubulares. Pero tal como se dijo, el solicitante no tiene claro el objeto de la solicitud.

5) Notificación

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación debe responder a la notificación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto por el numeral 5.2, literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en la lista, de fecha

13 JUL 2006

Concepto Técnico N° 1066	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202003	EXAMINADOR JURÍDICO Código No.
---------------------------------	--	-----------------------------------

38

PERRY MANUAL DEL INGENIERO QUÍMICO

**Sexta edición
(Tercera edición en español)**

Tomo VI

**Preparado por un equipo
de especialistas bajo la
dirección editorial de**

Robert H. Perry
Editor (fallecido)

Don W. Green
Editor
Conger-Gabel Professor of Chemical and
Petroleum Engineering
University of Kansas

James O. Maloney
Editor Asistente
Professor of Chemical Engineering
University of Kansas

McGRAW-HILL

**MEXICO • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA • LISBOA • MADRID • NUEVA YORK
PANAMÁ • SAN JUAN • SANTAFÉ DE BOGOTÁ • SANTIAGO • SÃO PAULO
AUCKLAND • HAMBURGO • LONDRES • MILÁN • MONTREAL • NUEVA DELHI • PARÍS
SAN FRANCISCO • SINGAPUR • ST. LOUIS • SIDNEY • TOKIO • TORONTO**

**PERRY
MANUAL DEL INGENIERO QUÍMICO**

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra,
por cualquier medio, sin autorización escrita del editor.

**DERECHOS RESERVADOS © 1992, respecto a la tercera edición en español por
McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE MÉXICO, S.A. de C.V.**
Atzacmulco 499-801, Fracc. Ind. San Andrés Atoto
53500 Naucapán de Juárez, Edo. de México
Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial, Reg. Núm. 1890

ISBN 988-422-086-0 "Obra Completa"
ISBN 988-422-976-3 Tomo VI

Traducido de la sexta edición en inglés de
PERRY'S CHEMICAL ENGINEERS' HANDBOOK
Copyright © MCMXXXIV, by McGraw-Hill, Inc., U.S.A.

ISBN 0-07-049479-7

5878901234 LI-93 8087543216

Impreso en México Printed in Mexico

Esta obra se terminó de
imprimir en Marzo de 1996 en
Litográfica Eros, S.A. de C.V.
Calz. Tlatilco Núm. 78
Col. Tlatilco
Delegación Azcapotzalco
02860 México, D.F.

Se tiraron 1500 ejemplares

El resultado neto de la fotosíntesis es la reducción del dióxido de carbono para formar carbohidratos. Un compuesto intermedio clave es el ácido

fosfoglicérico, y varios azúcares simples reaccionan y se desproporcionan a medida que se incorpora el carbono del dióxido de carbono.

REACTORES BIOLÓGICOS

Fermentadores Por lo general, las fermentaciones comerciales se realizan asépticamente en recipientes que se mantienen bajo una presión positiva de aire estéril para evitar la entrada de microorganismos contaminantes. Sin embargo en la producción de organismos patógenos, para propósitos médicos o para la guerra biológica, dichos recipientes se operan a baja presión, porque la seguridad de los operadores de la planta es más importante que la integridad del producto. En el tratamiento biológico de los desperdicios se utilizan cultivos de microorganismos seleccionados en equipo relativamente abierto. La fermentación se distinguía antiguamente por ser un proceso en el cual el oxígeno estaba ausente, pero en la actualidad el término se ha extendido a los procesos aeróbicos.

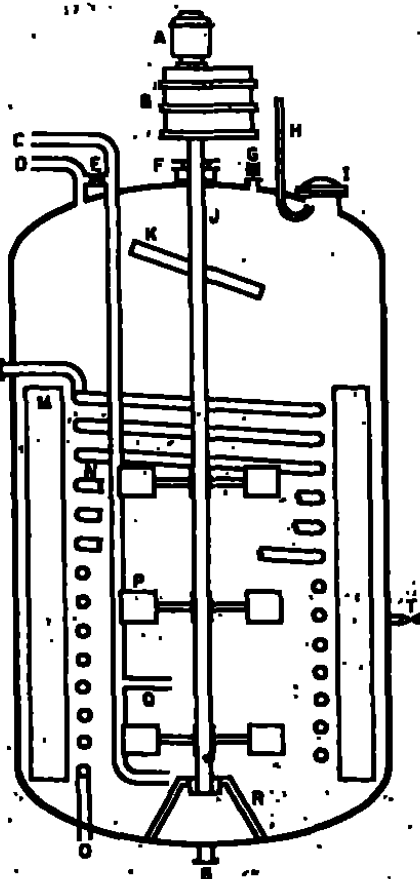


FIG. 27-3. Fermentador intermitente convencional. A = motor del agitador; B = mecanismo reductor de velocidad; C = entrada de aire; D = salida de aire; E = válvula de derivación de aire; F = sello del eje; G = malla con luz; H = malla de la línea de llenado; I = agujero de hombre con mirilla; J = eje del agitador; K = placa derivadora; L = serpentines de enfriamiento; M = entrada del agua de enfriamiento; N = calentador; O = rociador; P = cojinete y soporte del eje; Q = sello (el sello de vapor no se muestra); R = válvula de muestra (el sello de vapor no se muestra). En el diagrama no aparecen los palafios de la escalera para mantenimiento, la probeta de antisuspensión, el sistema de antisuspensión y los sensores (pH, oxígeno disuelto, temperatura, etc.). Obsérvese que 1) los serpentines pueden estar entre las placas derivadoras y la pared del tanque, 2) los serpentines pueden conectarse a la parte superior, para llevar al máximo las aberturas bajo el nivel de agua, y 3) son fáciles las entradas por la parte inferior para los mezcladores.

Las funciones deseadas en la fermentación son el contacto gas-líquido, la detección sobre la línea de las concentraciones, el muestreo, la transferencia de calor, el control de la espuma y la alimentación de nutrientes o reactivos como, por ejemplo, el utilizado para el control de pH. El caballo de batalla de la industria de la fermentación es el fermentador intermitente convencional, como el que aparece en la figura 27-3. Existe mucha tubería de proceso y los accesorios de cobre o latón se evitan, por los efectos altamente perjudiciales del cobre en muchos sistemas biológicos. Por ejemplo, se ha observado más del 50% de reducción en el rendimiento de las fermentaciones de penicilina cuando se coloca una válvula de bronce en la línea de alimentación. Para tanques más grandes deben utilizarse serpentines de enfriamiento o circulación, a lo largo de intercambiadores de calor externos, porque el área de una chaqueta es inadecuada para el enfriamiento desde la temperatura de esterilización hasta la de operación en un tiempo razonable. Las chaquetas pueden ser inadecuadas para las fermentaciones con un muestreo intenso, para satisfacer la demanda de oxígeno y el calor metabólico, producto de la rápida respiración y desarrollo de los microorganismos. Algunos aspectos interesantes para un fermentador convencional son que: 1) una válvula de derivación en el sistema de aire permite la derivación del aire para que la espuma no sea excesiva y el potencial de oxidación-reducción no sea demasiado elevado durante la primera etapa de la fermentación, cuando se comienza a establecer el inóculo; 2) se agrega antiespumante cuando la espuma excesiva llega a una probeta electrónica de conductividad o capacitancia, 3) toda la tubería está protegida contra la contaminación, mediante el empleo de vapor, 4) el nivel del líquido al llenar el recipiente está determinado por una referencia, respecto a una gráfica de calibración basada en los puntos dentro del tanque, como un travesaño en una escalera; 5) el peso del contenido del tanque se puede determinar mediante un balance hidrostático contra el aire que burbujea lentamente a través del rociador y 6) las bombas son poco comunes, porque es más fácil transferir el fluido desde un recipiente a presión.

La necesidad de una transferencia altamente eficiente de oxígeno en las fermentaciones, como las que utilizan hidrocarburos, ha dado por

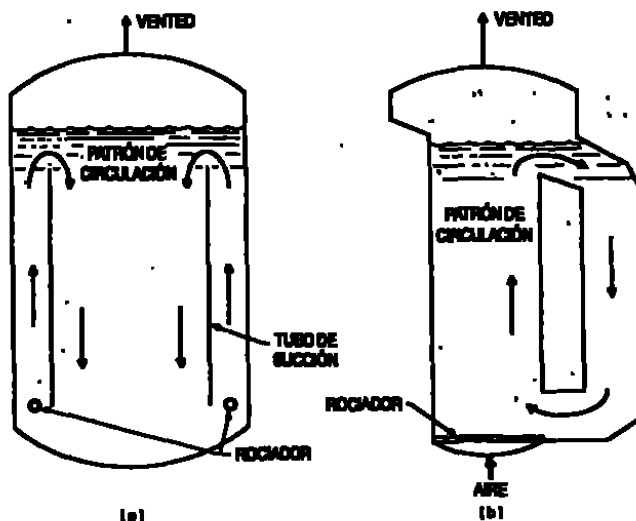


FIG. 27-4. Fermentadores con elevación de aire. a) Cilindro con succión. b) Recirculación externa.

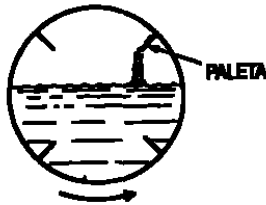


FIG. 27-5 Fermentador rotatorio.

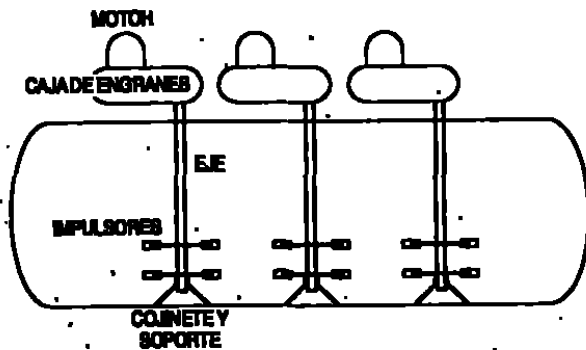


FIG. 27-6 Fermentador horizontal.

resultado los fermentadores con elevación de aire, como el que se muestra en la figura 27-4. El fermentador más grande del mundo fue diseñado para producir una proteína de una sola célula, a partir de hidrocarburos, y está en Billingham, Inglaterra. Dicho fermentador tiene 100 m (328 ft) de altura y un diámetro de 10 m (32.8 ft).

Se ha intentado hacer algunos cambios al fermentador estándar, pero ninguno se ha vuelto popular. Un diseño obsoleto en el cual gira el fermentador para aerear la parte de medio aparece en la figura 27-5. El rendimiento no fue satisfactorio y las unidades se reconstruyeron en la forma convencional, con rociadores y agitadores. Uno de los fermentadores más grandes, utilizado para la fabricación de antibióticos, consta de un cilindro horizontal con varios agitadores como el que aparece en la figura 27-6. Los agitadores múltiples también se han utilizado en los recipientes cilíndricos verticales.

La fermentación del etanol es un buen ejemplo de la acumulación de un producto que inhibe los cultivos microbianos. La mayor parte de cepas o especies de levadura tienen una velocidad de producción de alcohol más lenta, cuando el etanol alcanza aproximadamente 10% y las cepas del vino, o sake, que logran más del 20% en volumen de etanol son muy lentas. Un sistema conocido como Vacuform, para la eliminación del alcohol por destilación a medida que se forma, aparece en la figura 27-7. El vacío se ajusta a la presión de vapor de la mezcla agua-alcohol a la temperatura de fermentación ((30 a 40°C) (86 a 104°F)). La productividad volumétrica es bastante mejor que en un

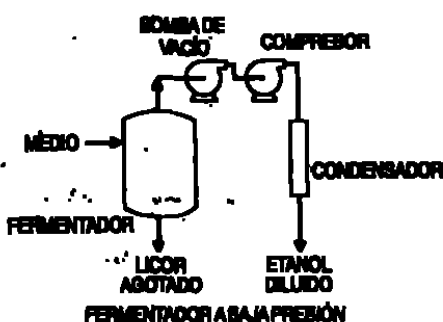


FIG. 27-7 Vacuform.

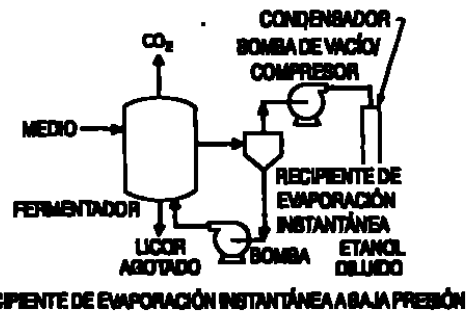


FIG. 27-8 Fermentador con recipiente de evaporación instantánea.

fermentador convencional, pero tiene la gran desventaja de tener que recomprimir grandes volúmenes de vapor, de tal manera que el alcohol se pueda condensar con el agua normal de enfriamiento, en vez de utilizar una salmuera fría costosa. Además, las grandes cantidades de dióxido de carbono generadas por la fermentación se evacúan y recomprimen junto con los vapores de alcohol y agua. Un mejor diseño es el que aparece en la figura 27-8, en el cual el fermentador opera a la presión normal, para liberar el dióxido de carbono. Se recircula caldo o licor a través de la olla de vaporización para evaporar el etanol. Apesar de que este sistema parece tener un ahorro atractivo de energía, por la eliminación del calor metabólico en los vaporizadores; la inversión inicial y el costo de bombeo de los vapores son elevados. La operación del fermentador de etanol a temperaturas más elevadas con organismos termofílicos es más económica, porque se requiere un vacío y una recompresión menores, debido a la presión de vapor más elevada. Otras opciones para superar la inhibición producida por el producto son la extracción del caldo o licor de fermentación con un disolvente inmiscible y/o la operación con cultivos muy densos, para que la baja productividad por célula se ve compensada por la obtención de muchas más células.

Se pueden lograr concentraciones más densas de células mediante la separación de las células a la salida y su recirculación al fermentador. Esta ha sido una práctica estándar durante muchos años en el tratamiento biológico de los desperdicios, cuando las corrientes diluidas de alimentación dan por resultado un crecimiento lento del cultivo. La producción de flóculos celulares, que se recolectan fácilmente por sedimentación, se ve mejorada por la recirculación de las células que se sedimentan. Esta es una ventaja selectiva que puede permitir que aquellas células dominen. La fermentación industrial puede afrontar mayores gastos que el tratamiento de los desperdicios, y las centrifugas para recolectar las células son comunes. El reciclaje de células de levadura a un fermentador de etanol puede disminuir considerablemente el tiempo de fermentación. Ciertas células muy coaguladas pueden quedar en el fermentador. La torre de fermentación mostrada en la figura 27-9 utiliza este principio, con cepas o especies de levadura que flucu-

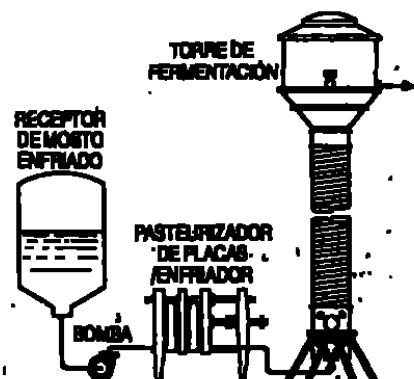


FIG. 27-9 Torre de fermentación. (Cortada de APV Corp.)

TABLA 27-1 Comparación de los fermentadores de etanol

Sistema	Tiempo característico h	Concentración característica de etanol, %
Convencional	72	10
Con recirculación de células	12	8
Torre de fermentación	3	8
Inmovilización con gel	1	10

lan en forma natural. Las células se pueden mantener también en el reactor mediante la unión a un soporte. En ocasiones, el vinagre se produce en un "generador" relleno de virutas de madera, a las que se unen las bacterias. Materiales de apoyo hechos con rocas o plástico se utilizan en los filtros de asperamiento para el tratamiento de los desperdicios (véase la Secc. 26). Existen agentes químicos que pueden enlazar las células a los materiales de apoyo cuando la adsorción simple no las mantiene lo suficientemente sujetas. El atrapamiento con gel puede proporcionar concentraciones extremadamente elevadas de células, porque las células siguen multiplicándose dentro del gel. Comparaciones de los resultados obtenidos con la fermentación del etanol aparecen en la tabla 27-1.

La fermentación se puede combinar con otras operaciones. Por ejemplo, la inhibición de retroalimentación de la hidrólisis enzimática de la celulosa se puede aligerar mediante la eliminación de la glucosa producida por medio de su fermentación a medida que ésta se forma.

Las válvulas y bombas que tienen una trayectoria potencial para la contaminación de los microorganismos son un tabú para las operaciones asépticas. Las válvulas cuyo vástago se eleva pueden llevar a los organismos al lado estéril por el movimiento de entrada y salida que efectúa la válvula. Las válvulas de diafragma todavía se emplean, pero el calentamiento, el enfriamiento y la abrasión producida por los sólidos en el medio nutritivo presentan condiciones severas que llevan a la ruptura ocasional de un diafragma con la consiguiente contaminación de la corrida. Las válvulas de globo o de tapón no brindan un sello absoluto contra el medio exterior, pero la dirección del movimiento no deja entrar los organismos al sistema. La contaminación rara vez se puede atribuir a estas válvulas; están diseñadas para un mantenimiento fácil y tienen una ventaja grande desde el punto de vista humano, pues con un vistazo a la manija se puede saber si la válvula está abierta o cerrada. Muchas corridas se han echado a perder porque una válvula manual se ha dejado en la posición incorrecta. Para las operaciones de planta, las bombas de diafragma son satisfactorias. En el laboratorio o en una planta piloto predominan las bombas peristálticas (también conocidas como exprimidores de turbina).

Por lo general, la transferencia de fluidos en una planta de fermentación utiliza las diferencias de presión de aire. Uno o más cabezales múltiples pueden interconectar muchos recipientes y como la transferencia tiene que ser aséptica, los cabezales se presurizan con vapor en el momento en que se van a utilizar. Un arreglo característico de los sellos de vapor se muestra en la figura 27-10.

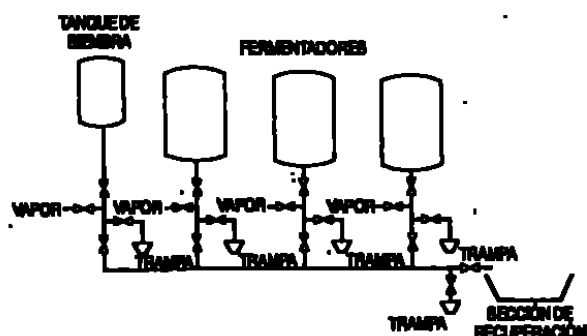


FIG. 27-10 Cabezal de inoculación y cosecha.

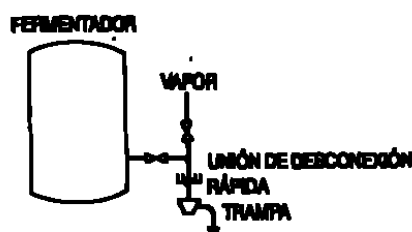


FIG. 27-11 Tubería de la línea de muestreo. (Puede tener una válvula al drenaje, que permita la derivación de la trampa, mientras se enfría la línea.)

Las líneas de muestreo también tienen sellos de vapor. Un arreglo característico aparece en la figura 27-11. En posición cerrada, el vapor proporciona una barrera absoluta contra la contaminación. Para tomar una muestra, se cierran las líneas de vapor y la de la trampa, y el medio de fermentación se deja fluir hasta desperdiciarse y hasta que la línea se aleja fría, para que los productos sensibles no den resultados falsos por destrucción térmica. El enfriamiento toma hasta 5 L del medio si no se realiza con cuidado y las prácticas erróneas pueden desperdiciar una cantidad mucho mayor. Los tanques para planta piloto tienen menos accesorios masivos que se puedan enfriar más fácilmente. Se desperdicia menos medio, pero el sobremuestreo hasta el punto en que el volumen del fermentador sea bajo puede ser un problema. Por este motivo se han desarrollado métodos opcionales de muestreo. Por ejemplo, se puede utilizar una aguja y jeringa estéril para muestrear a través de un diafragma de hule, colocado en la pared del tanque. A pesar de que dichos métodos son confiables en apariencia, existe una tendencia a desechar todas las innovaciones y regresar al método comprobado de los sellos de vapor cuando en una fábrica se detecta un período de contaminación.

Durante el período de esterilización toda la tubería del fermentador se sopla con vapor. Un método para la limpieza de las mirillas utiliza condensado, que es estéril por naturaleza, en un trazo inmóvil. La presión del vapor atrás del condensado empuja el agua a las mirillas; si no se limpian, las salpicaduras o rocíos pueden cubrir rápidamente a las mirillas con una capa gruesa de microorganismos y medio.

A pesar de que es fácil agregar materiales a la fermentación, su eliminación es difícil. Se han instalado dispositivos de membrana en los fermentadores o en los circuitos externos de reciclaje, para dializar los compuestos solubles. Las células liberan a veces desperdicios o

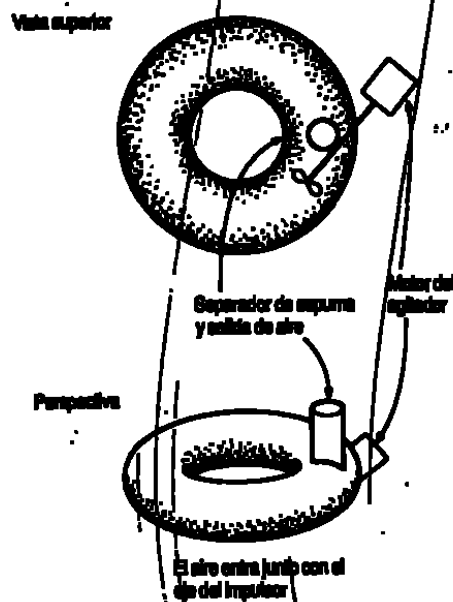


FIG. 27-12 Fermentador toroidal.

metabolitos que pueden ser inhibidores; éstos se conocen como factores de atascamiento. La eliminación por diálisis ha permitido que las concentraciones de células sean de 10 a 100 veces la concentración de los cultivos de control.

Otro diseño nuevo es el fermentador toroidal mostrado en la figura 27-12. El movimiento en una dirección axial permite un mezclado adecuado con el aire. Un caso especial del fermentador con elevación de aire se muestra en la figura 27-13. La alimentación entra a una presión moderada y es arrastrada hacia abajo, a regiones de muy alta presión hidrostática, que proporciona una gran fuerza impulsora para la transferencia de gas. En el otro brazo, al disminuir la presión se permite que los gases se expandan, proporcionando el impulso necesario para la circulación. Se han construido unidades experimentales en ejes de elevadores.

Los sustratos sólidos como, por ejemplo, la madera, no se pueden agitar cuando la concentración de la lechada excede aproximadamente el 10%. Para la sacarificación, anterior a la fermentación del etanol, mantener alta la concentración de azúcar puede evitar el paso de evaporación. En un reactor intermitente, las limitaciones de mezclado con la madera dan por resultado una solución diluida de azúcar. Esto se ha evitado mediante la colocación de la madera en una columna y el paso de la solución a través de ella. A medida que se disuelve la madera, se agrega más. Se pueden fermentar simultáneamente los azúcares formados en la columna.

Transferencia de oxígeno El suministro de una cantidad suficiente de oxígeno puede ser todo un reto a la ingeniería en algunos fermentadores aeróbicos. El oxígeno es muy poco soluble en agua. La saturación con aire a la temperatura ambiente proporciona sólo 6 a 7 mg/L de oxígeno. En un proceso vigoroso se puede agotar el oxígeno disuelto en unos cuantos segundos cuando se detiene la aereación. La transferencia de masa de gases a líquidos se trata en la sección 18. Sin embargo, este fenómeno es en parte diferente para los sistemas biológicos con aereación por burbujas. Ya que el número y tamaño de las burbujas es muy difícil de estimar, el área de transferencia se suele incorporar en el coeficiente de transferencia de masa, $K_L a$. El subíndice L significa que la resistencia de la película líquida debe controlar la transferencia para gases muy poco solubles, como es el caso del oxígeno. La relación entre la concentración de oxígeno es del tipo Michaelis-Menten (véase la Fig. 27-26). Cuando, en un proceso, el oxígeno limita la velocidad, también se incrementa rápidamente la

velocidad específica de respiración (Q_{O_2}), hasta llegar a una porción plana de la curva. La concentración por debajo de la cual la respiración se ve muy limitada se conoce como "concentración crítica de oxígeno", que, en forma característica, varía entre 0.5 y 2.0 ppm para las bacterias, la levadura y los hongos bien dispersados, que crecen entre 30 y 40°C (86 a 104°F). Arriba de esta concentración crítica, la toma específica de oxígeno se incrementa ligeramente al aumentarse la concentración de oxígeno.

Una gráfica de la velocidad específica de respiración, Q_{O_2} , en función del coeficiente de crecimiento específico, es lineal con la interceptación sobre el eje de ordenadas igual a la velocidad de toma de oxígeno para el mantenimiento de la célula. Una formulación de lo anterior es:

$$\text{Velocidad de toma} = \text{toma de mantenimiento} + \text{toma de crecimiento}$$

$$Q_{O_2} X = (Q_{O_2})_M X + \mu X (1/Y_O) \quad (27-1)$$

donde X es la concentración de organismos, Y_O es el rendimiento de masa celular por unidad de masa de oxígeno y el término Q significa las velocidades de toma de oxígeno en masa de O_2 /masa de organismos.

Este tipo de correlación se aplica a casi todos los sustratos incluidos en el metabolismo de la energía celular y está apoyada por datos experimentales y consideraciones energéticas. Sin embargo, está basada en suposiciones verdaderas en condiciones de equilibrio a régimen permanente o cerca de ellas y puede no ser válida durante los estados transitorios. La ecuación de la toma de oxígeno debe modificarse cuando se pueden identificar otras actividades celulares que requieren oxígeno. Por ejemplo, el uso de oxígeno para la formación del producto se puede representar por

$$\text{Velocidad} = \text{toma de mantenimiento} + \text{toma de crecimiento} + \text{toma del producto}$$

$$Q_{O_2} X = (Q_{O_2})_M X + \frac{dX}{dt} \frac{1}{Y_C} + \frac{dP}{dt} \frac{1}{Y_P} \quad (27-2)$$

donde P es la concentración del producto, y Y_P es el rendimiento de la masa de producto por unidad de masa de toma de oxígeno. La toma de oxígeno se distribuye entre la toma para el crecimiento y la que requieren las actividades celulares que dependen de la concentración de células.

Como la velocidad de transferencia de oxígeno en condiciones de régimen permanente debe ser igual a la toma de oxígeno, $K_L a$ se puede calcular a partir de

$$K_L a = \text{velocidad total de toma de oxígeno} / (C^* - C)_{\text{media}} \quad (27-3)$$

donde C representa la concentración de oxígeno en las burbujas de gas, C^* es la concentración de oxígeno en el líquido que está en equilibrio con la concentración de burbujas de gas y $K_L a$ es la velocidad volumétrica de transferencia de oxígeno.

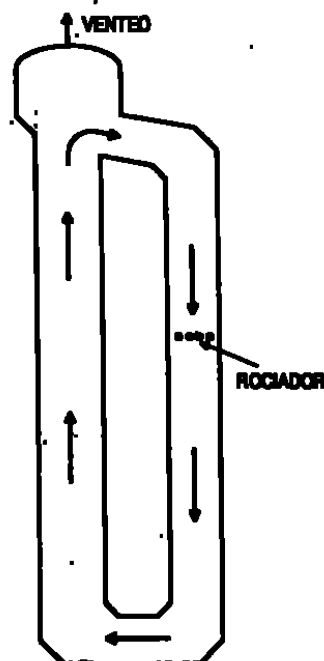


FIG. 27-13 Fermentador de eje profundo.

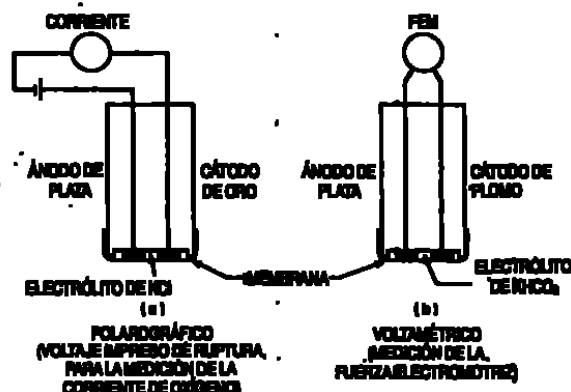


FIG. 27-14 Electrodos para el oxígeno disuelto. a) Polarográfico (Voltaje impuesto de ruptura, para la medición del contenido de oxígeno). b) Voltamétrico (medición de la fuerza electromotriz).

Un método conveniente para medir las velocidades de transferencia de oxígeno en los sistemas microbianos es el de los electrodos de oxígeno disuelto, con tiempos de respuesta relativamente rápidos. Se dispone de electrodos de oxígeno muy económicos para utilizarse con los sistemas abiertos, y hay electrodos esterilizables con vapor para los sistemas estériles. Existen dos tipos básicos de electrodos: uno desarrolla un voltaje a partir de una celda electroquímica, basada en el oxígeno, y el otro consta de una celda polarográfica, cuya corriente depende de la velocidad con que llega el oxígeno (véase la Fig. 27-14). La medición de las propiedades de transferencia del oxígeno requiere sólo una breve interrupción del suministro de oxígeno. Un balance de masa para el oxígeno es

$$dO/dt = \text{velocidad de suministro} - \text{velocidad de toma} \quad (27-4)$$

Un rastreo de la señal del electrodo durante un ciclo de acreación de volteo de encendido y apagado se muestra en la figura 27-15. La velocidad de suministro es igual a cero (después de que han escapado las burbujas) en la primera parte de la curva de respuesta; por consiguiente, la pendiente es igual a la velocidad de toma de los organismos. Cuando se reanuda la acreación, se aplican tanto los términos de velocidad de suministro como los de toma. Los valores de $(C^* - C)$ se pueden calcular a partir de los datos. Por consiguiente, con base en la pendiente de la curva de respuesta en un punto dado, todos los valores de la ecuación son conocidos, salvo $K_L a$, que se puede despejar.

Los estudios de la velocidad de acreación cuando el fermentador se ha llenado con soluciones de productos químicos oxidables tienen poco valor para determinar las velocidades en los sistemas biológicos. No sólo difieren los modelos de flujo y el tamaño de las burbujas, sino también los agentes surfactivos y las partículas en suspensión que pueden perjudicar mucho la transferencia de gas. En la figura 27-16 se aprecia el efecto de las diferentes partículas. En general, las partículas esféricas tienen poco efecto, y lo tienen mayor las alargadas; las enredadas perjudican considerablemente la transferencia. Como muchos

cultivos de moho están entrelazados y se encuentran presentes lípidos y proteínas con fuerte actividad superficial, la transferencia de oxígeno en la fermentación puede ser mucho más lenta que la que se tiene con las soluciones acuosas simples.

Rara vez se considera el dióxido de carbono en las fermentaciones, pero desempeña un papel importante. Su participación en el equilibrio del carbonato afecta el pH. La eliminación del dióxido de carbono por fotosíntesis puede elevar el pH a más de 10 en cultivos de algas densos y bien iluminados. Varias reacciones bioquímicas incluyen dióxido de carbono; por consiguiente, su cinética y las concentraciones de equilibrio dependen de las concentraciones de gas, y las velocidades metabólicas de las reacciones asociadas también pueden cambiar. Se ha intentado incrementar las velocidades de transferencia de oxígeno al elevar la presión, para obtener una mayor fuerza de impulso, pero en ocasiones da por resultado un mal rendimiento del proceso, que se puede atribuir a un exceso de dióxido de carbono disuelto.

Sistemas rociadores Los rociadores de gas se analizan con detalle en la sección 18. En las fermentaciones industriales son deseables los rociadores con grandes aberturas, para evitar el taponamiento debido al desarrollo de los microbios. Se utilizan agujeros o difusores relativamente pequeños en las unidades de sedimento activado para el tratamiento biológico de los desperdicios, aunque por lo general existe un medio para sacar una sección del aerador fuera del recipiente con objeto de limpiarla. Los diseños recientes de fermentadores están concebidos como una respuesta al problema de transferencia de oxígeno. El fermentador con elevación de aire (Fig. 27-4) crea un mezclador íntimo del aire y el medio, ya que utiliza la flotabilidad del gas para mezclar el fluido.

Las sustancias surfactivas también producen espuma, que puede ser tan perjudicial que la mayor parte del contenido del fermentador se pierda. Los dispositivos mecánicos antiespumantes son útiles, pero no pueden funcionar solos, salvo cuando hay poca propensión a la formación de espuma. Los rompedores mecánicos de espuma rompen las

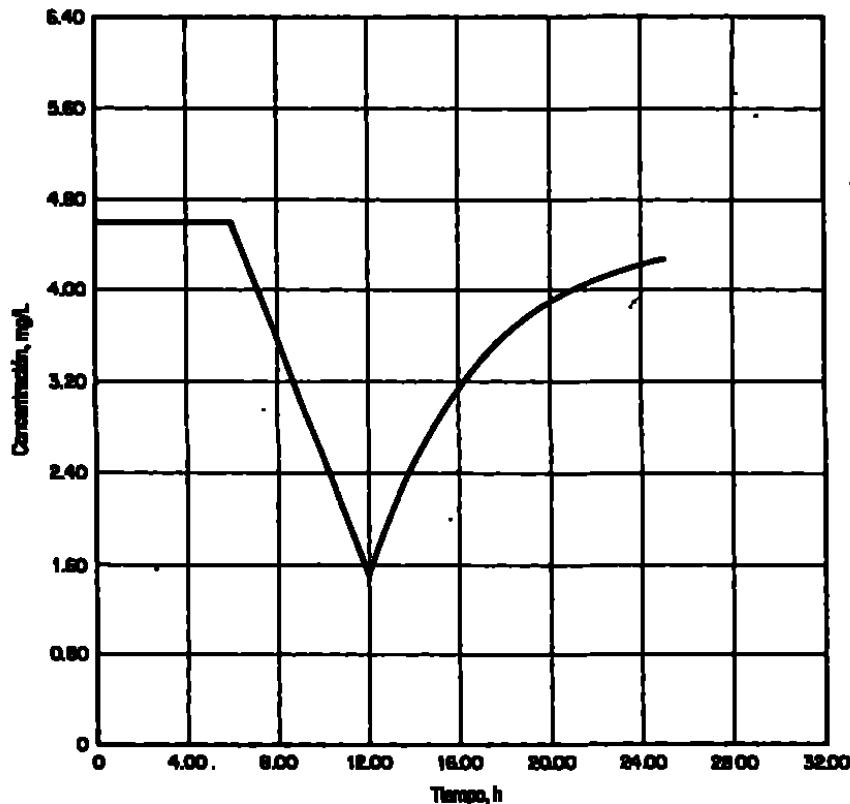


FIG. 27-15 Medición dinámica de $K_L a$.

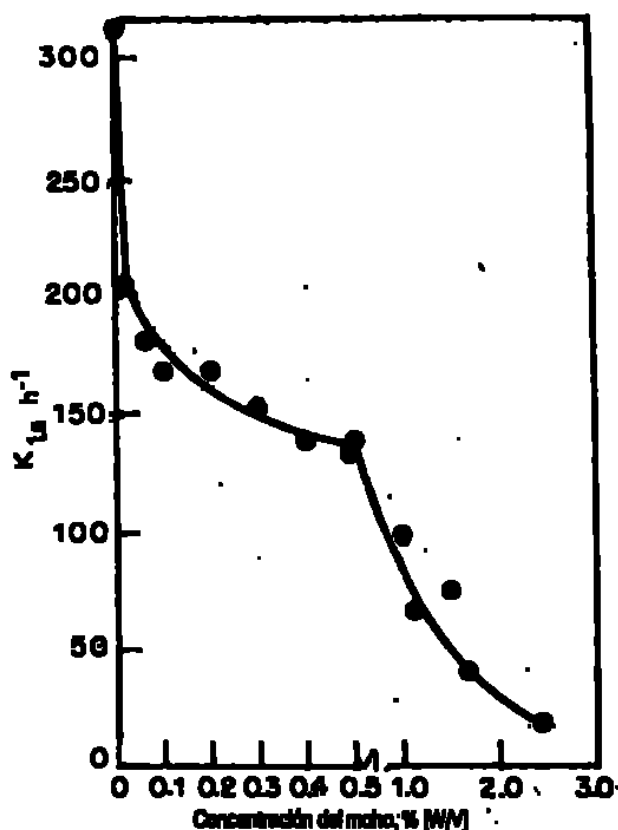
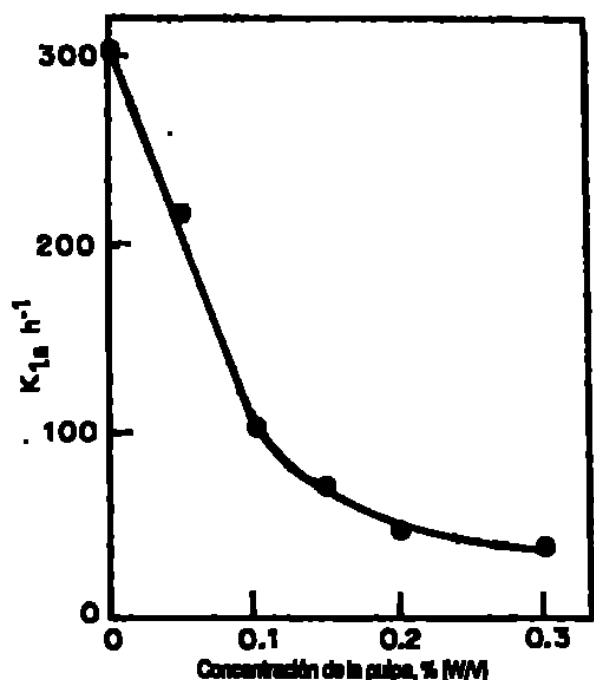


FIG. 27-16 Efecto de los sólidos sobre K_{La} . Condiciones de operación: velocidad del agitador, 800 rpm; flujo de aire, 2.5 L/min. [M.R. Bristy y R. Steel, *Appl. Microbiol.*, 7, 57, (1959). (Cortesía de la American Society for Microbiology.)]

burbujas grandes y débiles, aunque permiten que las pequeñas y resistentes se acumulen. Los agentes surfactivos antiespumantes tienden a reducir la elasticidad de las burbujas, de tal manera que los golpes mecánicos se puedan transmitir fácilmente y favorezcan la ruptura. Varios sistemas de suministro de antiespumante aparecen en la figura 27-17. Algunos lípidos utilizados como antiespumantes son metabolizados por el cultivo y deben reemplazarse. La nutrición suministrada por estos aceites puede ser benéfica, pero son mucho más costosos que sus equivalentes, los nutrientes carbohidratados. Además, es un problema tener la nutrición asociada al control de espuma. Varios agentes antiespumantes que no son nutrientes tienden a persistir. Su tendencia a perderse, al recubrir las superficies de los sólidos en el fermentador, significa que ocasionalmente deben agregarse más agentes. Varios agentes antiespumantes sintéticos son tóxicos para algunos microorganismos, pero uno de los muchos tipos disponibles suele ser satisfactorio.

Escala miento Los fermentadores que varían desde 2 hasta más de 100 L (0.07 a 3.5 ft³) se han utilizado para la investigación y el desarrollo. Los de tamaño más pequeño proporcionan muy poco volumen

para el muestreo y son difíciles de duplicar, en tanto que los recipientes grandes son muy costosos y utilizan demasiado medio. La meta al utilizar un equipo pequeño es proporcionar guías para el diseño de las unidades de gran tamaño. Los refinamientos menores se realizan mejor en el equipo de producción, mientras que la planta piloto se utiliza para ampliar los amplios intervalos de variables.

Un medio eficaz de escala miento para los procesos aeróbicos consiste en medir el nivel de oxígeno disuelto que es adecuado para el equipo pequeño y para ajustar las condiciones de la planta hasta alcanzar este nivel de oxígeno disuelto. Sin embargo, algunas fermentaciones de antibióticos, así como la producción de levadura para forraje a partir de sustratos de hidrocarburos, tienen requerimientos muy estrictos y los diseñadores están muy presionados para suministrar el oxígeno suficiente.

Los métodos antiguos de escala miento para los procesos de fermentación se basaban en la similitud geométrica, al utilizar las dimensiones físicas proporcionales. Se pensó que al aplicar la misma potencia por unidad de volumen que se tenía en la planta piloto, esto daría un rendimiento equivalente del proceso en los fermentadores grandes. Las fermentaciones de antibióticos requieren una potencia del mezclador que varía de 0.2 a 2 kW/m³ (0.1 a 1 hp/100 g). Como los dispositivos de mezcla tienen áreas (dimensiones cuadradas) para suministrar un volumen (dimensiones cúbicas), los métodos basados en la similitud dimensional son fundamentalmente inadecuados. El escala miento que se basa en el coeficiente de transferencia de oxígeno equivalente k_L es razonablemente satisfactorio.

El número de Reynolds del impulsor y las ecuaciones para la potencia de mezcla de partículas en suspensión se presentaron en la sección 19. La dispersión de gases en líquidos se analiza en la sección 18. Por lo general, un incremento en la agitación mecánica es más eficaz para mejorar la transferencia de masa, que un aumento en la velocidad de aeración.

Otros factores del escala miento son el esfuerzo cortante, el tiempo de mezcla, el número de Reynolds, el momento y el mezclado que proporcionan las burbujas ascendentes. El esfuerzo cortante es máxi-

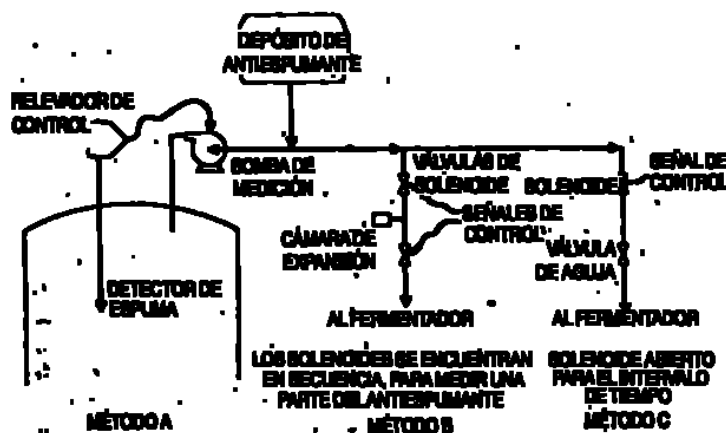


FIG. 27-17 Sistemas de antiespumante.

mo en la punta del impulsor y puede estimarse a partir de la ecuación (27-5) [R. Stall y W. D. Mason, *Biotechnol. Bioeng.*, 4, 231 (1962)].

$$S_r = S_i (D_i/D_o)^{1/3} \quad (27-5)$$

donde S_i y S_r son los esfuerzos cortantes en los recipientes más pequeño y grande, respectivamente, y D_i y D_o representan los diámetros de los impulsores de los recipientes más pequeños y grandes.

Algunas fermentaciones miceliales presentan una esporulación prematura, la ruptura del micelio y bajos rendimientos si el esfuerzo cortante es excesivo. Una velocidad en la punta de 250 a 500 cm/s (8 a 16 ft/s) se considera razonable. Se ha propuesto el tiempo de mezclado como una consideración para el escalamiento, mas poco se puede hacer para mejorarlo en un fermentador grande, porque se requieren motores demasiado grandes para lograr un mezclado rápido.

El número constante de Reynolds no se utiliza para el escalamiento de la fermentación, y es exclusivamente un factor de la aereación. Lo anterior también es válido si se considera el impulsor como una bomba y se intenta su escalamiento por medio de un momento constante. Como el mezclado mecánico tiende a predominar sobre el efecto de las burbujas en el mejoramiento de la aereación, las ecuaciones que incluyen los efectos de las burbujas se emplean poco.

Las productividades de la biomasa en la fermentación varían, por lo general, entre 2 y 5 g/(L·h) [0.12 a 0.31 lb/(ft³·h)]. Esto representa una demanda de oxígeno del orden de 1.5 a 4 g de O₂/(L·h) [0.093 a 0.25 lb/(ft³·h)]. En un fermentador de 500 m³ (18 000 ft³) lo anterior significa el logro de un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno del orden de 250 a 400 h⁻¹. Estas capacidades de transferencia de oxígeno sólo se pueden obtener con velocidades de aereación del orden de 0.5 VVM (volumen de aire en STP/volumen de licor o caldo) y con entradas de potencia de agitación mecánica bastante excesivas, que varían entre 2.4 y 3.2 kW/m³ (1.2 a 1.6 hp/100 gal).

A menudo, la eliminación de calor causa problemas de diseño para el escalamiento. La agitación mecánica junto con el calor metabólico de la biomasa en desarrollo supera la capacidad de enfriamiento de un fermentador grande equipado con una sola chaqueta. En consecuencia, deben utilizarse extensos serpentines de enfriamiento en el interior del fermentador o un sistema de circulación externa, a través de un intercambiador de calor. Por lo general, en fermentaciones altamente viscosas, los serpentines de enfriamiento interno no son deseables, porque causan interferencia con los patrones de mezclado. Existen varios esquemas para la eliminación de calor en los fermentadores grandes, como, por ejemplo, las placas desviadoras de medio serpentin (serpentines de placa) y los tubos de armate.

La evaporación del medio proporciona poco enfriamiento. El aire de entrada a los filtros de partículas no debe estar cerca del punto de saturación, porque la condensación de la humedad en el medio filtrante promueve los microorganismos contaminantes y, en consecuencia, las posibilidades de penetración se incrementan considerablemente. En ocasiones se utiliza aire humidificado y el filtro se calienta para prevenir la condensación. Sin embargo, esto es común sólo para el equipo pequeño, en el cual las operaciones adicionales son relativamente sencillas de instalar y mantener.

Una vez que se ha construido la planta, las condiciones de agitación, aereación, transferencia de oxígeno y de calor están más o menos establecidos y se pueden definir los ciclos de esterilización. Las condiciones del medio que se pueden lograr en el equipo de la planta, deben reducirse para el equipo de la planta piloto y el laboratorio (los matraces agitados) con objeto de asegurar que se pueden trasladar los resultados.

Esterilización Algunas fermentaciones antiguas y tradicionales como, por ejemplo, la de alcohol y encurtidos, las realizan organismos que son fuertes y luchan por su causa, al crear condiciones desfavorables para sus competidores. La levadura, por ejemplo, reduce el pH mediante la producción de ácidos a partir de azúcares y su tolerancia al alcohol es otra ventaja poderosa que le permite ejercer su dominio. Aun así, las fábricas modernas utilizan técnicas asépticas o extremas los cuidados para reducir al mínimo la contaminación, que puede ser un riesgo para la calidad del producto al afectar el sabor, la textura, el

aroma o la apariencia. Los bioprocesos, como el cultivo de tejidos para producir vacunas, se contaminan muy fácilmente, porque existe una abundancia de nutrientes y no hay protección inherente contra los organismos extraños. Por tanto, existe un intervalo que va desde la buena autoprotección hasta prácticamente ninguna. El valor del producto y la necesidad de un control de calidad determinan el incremento de las medidas de precaución que se deben tomar. La esterilidad, desde el punto de vista práctico, es estadística, porque casi siempre están presentes microorganismos extraños, pero, en general no se propagan con la suficiente rapidez como para daar una corrida. La buena protección contra la contaminación es relativamente económica, en tanto que la protección absoluta es imposible y los intentos que se hagan para lograrla pueden ser sumamente costosos. La producción de agentes para la guerra biológica requiere cuidados máximos para mantener a los organismos alejados de los trabajadores; sin embargo, el personal que opera los fermentadores muere en raras ocasiones. Las fermentaciones industriales más costosas y mejor protegidas se ven contaminadas a veces. Las técnicas de asepsia y de esterilización para mantener los bioprocesos sin contaminación pueden ser básicas.

Los métodos comunes de esterilización son 1) la eliminación de microorganismos por filtración y 2) materiales con calor o productos químicos. La esterilización por filtración es una operación unitaria estándar que se trató en la sección 19. Las diferencias para la ingeniería bioquímica son que 1) el medio filtrante y las líneas aguas abajo se tratan con vapor, a una presión a la cual la temperatura mata todos los organismos y esporas; 2) el tamaño de las partículas a eliminar es del orden micrométrico y 3) el medio filtrante debe ser reutilizable y no degradarse por el calentamiento repetido.

Esterilización por filtración El aire se esteriliza casi siempre por filtración. El empleo de calor a pequeña escala ha sido satisfactorio, pero el equipo grande para el calentamiento de la corriente de aire hasta las temperaturas de esterilización no es lo bastante seguro. A pesar de que parece muy sencillo mantener a alta temperatura una sección de la tubería de suministro de aire, se requieren controles automáticos para los ajustes debidos a variaciones en la transferencia de calor, causados por cambios en la velocidad de flujo, y además se necesita una sección de enfriamiento de aire, para prevenir la carga excesiva de calor en el fermentador. Por otra parte, los costos de energía son, en la actualidad, mucho mayores que cuando al calentamiento parecía ser una opción prometedora en relación con la filtración. Para los gases de salida de la fermentación que tienen organismos peligrosos, el calentamiento es una medida de precaución razonable y al costo no es el factor clave.

La esterilización de líquidos por filtración se ha realizado en forma satisfactoria desde la aparición de los filtros de membrana con un diámetro pequeño del poro. Cuando el calor daña los ingredientes, la filtración es una selección ideal. Sin embargo, el equipo y manejo adicional requeridos son una desventaja de la filtración, porque la esterilización con calor es fácil y relativamente económica. El tanque tiene que ser esterilizado con vapor; en consecuencia, conviene llenarlo primero y esterilizar también el contenido. Cuando algunos constituyentes no deben someterse a calentamiento, es costumbre esterilizar el resto del medio con calor y filtrar las soluciones concentradas de los ingredientes delicados.

La magnitud del problema de la esterilización del aire se aprecia en las necesidades usuales de una fermentación altamente aeróbica en la que se utiliza aproximadamente un volumen de aire por volumen de medio por minuto. Para una fábrica con 20 fermentadores de 100 000 L cada uno, se necesitan dos millones de L/min (70 000 ft³/min) de aire. Se utilizan compresoras muy grandes y, por lo menos, se requieren dos, para que una pueda estar en mantenimiento.

En la figura 27-18 se presentan los datos característicos de rendimiento para la eliminación de bacterias de las corrientes de aire mediante filtros de fibra. Para un filtro determinado existe una velocidad intermedia del aire a la que la eficiencia de filtración es mínima, debido a que predominan distintos mecanismos de recolección para los diferentes intervalos de la velocidad del aire. A bajas velocidades son importantes las fuerzas gravitacionales, de difusión y electrostáticas ejercidas sobre las partículas y sus efectos son inversamente propor-

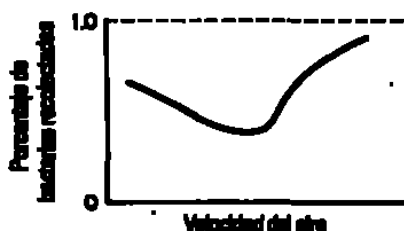


FIG. 27-18 Recolectora característica de bacterias mediante un filtro de fibra.

cionales a la velocidad del aire. A velocidades altas, las fuerzas de inercia, que son directamente proporcionales a la velocidad del aire, desempeñan el papel principal. La naturaleza de los efectos de inercia es tal que por debajo de determinada velocidad del aire su efecto sobre la recolección es igual a cero. Si el diseño del filtro se basa en el rendimiento observado a una velocidad de operación distinta a la que ocurre la eficiencia mínima, las sobretensiones o las fallas breves de potencia pueden crear periodos de operación con baja eficiencia. Para la recolección de partículas bacterianas de $1\text{ }\mu\text{m}$ con una gravedad específica de 1.0, contenidas en las corrientes de aire a temperatura y presión del aire ambiente, esta velocidad es igual (en unidades SI) a

$$V_{\text{min}, \text{er}} = 0.02 \, d_f \quad (27-6)$$

donde la velocidad $V_{\text{min}, \text{er}}$ está en metros por segundo y el diámetro de la fibra, d_f , está en micrómetros.

En la actualidad, existe una tendencia a utilizar los filtros de membrana para la esterilización del aire con objeto de obtener un excelente rendimiento con unidades de tamaño relativamente pequeño. A pesar de que las membranas son bastante eficientes para la filtración del aire y tienden a capturar partículas más grandes que el diámetro del poro, la humedad puede ayudar a que pasen. Para mayor seguridad se recomienda un diámetro del poro de 0.2 a $0.3\text{ }\mu\text{m}$. Las membranas hidrofílicas no deben utilizarse, porque mantienen humedad estrechamente dentro de los poros y no la desaloja a menos que se produzcan caídas altas de presión a través de la membrana. La humedad tiende a drenarse de las membranas hidrofóbicas y recolectarse en un sumidero. El tamaño del filtro de membrana utilizado para la filtración del aire depende del número de cartuchos necesarios. Sólo el 60% de la caída de presión disponible debe utilizarse en el cálculo para considerar la resistencia incrementada que ofrecen las partículas al recolectarse en la membrana. En la figura 27-19 aparece un filtro con 12 cartuchos de membrana junto con una gráfica de las velocidades características de flujo en función de la caída de presión.

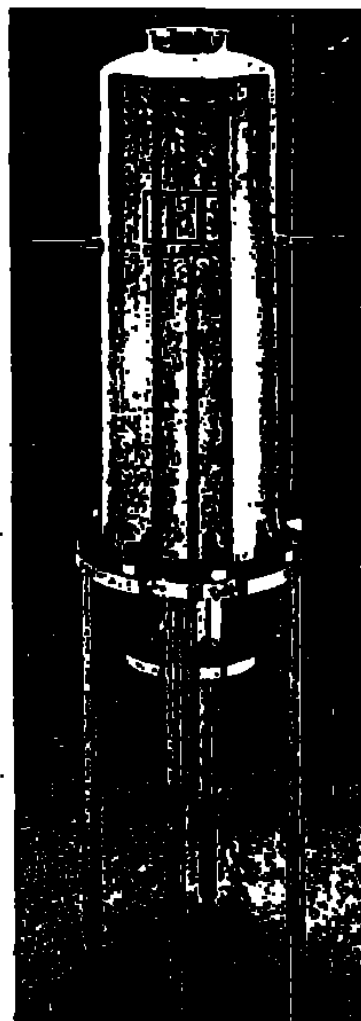
Esterilización del medio Se puede suponer una cinética de primer orden para la destrucción de la materia viva por medio de calor y esto lleva a una relación lineal, donde el logaritmo de la fracción sobreviviente se grafica en función del tiempo. Sin embargo, una cinética no logarítmica de las partículas muertas se encuentra, a menudo, para las esporas de las bacterias. En un modelo de dicho comportamiento se supone una inactivación de las esporas a través de un estado intermedio sensible, representado por el mecanismo



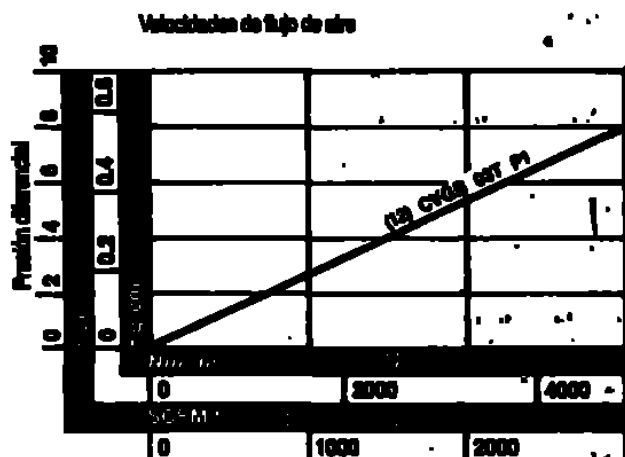
donde C_A , C_B y C_D son las concentraciones de esporas resistentes, sensibles y muertas, respectivamente. Las gráficas características aparecen en la figura 27-20.

En la tabla 27-2 se muestra la resistencia térmica relativa para los diferentes tipos de microorganismos que se encuentran en los medios característicos relacionados con los licores o caldos de fermentación. Las esporas de las bacterias son bastante más resistentes al calor que, a menudo, cualquier otro tipo de contaminantes microbianos. Por consiguiente, un ciclo de esterilización basado en la destrucción de las esporas de las bacterias debe destruir toda la vida.

Como lo predice la ecuación de Arrhenius (Secc. 4), una gráfica de la velocidad de muerte de los microbios en función del recíproco de la temperatura suele ser lineal y la pendiente es una medida de la suscep-



(a)



(b)

FIG. 27-19 Unidad de 12 cartuchos y datos de presión para un cartucho. a) Alojamiento para 12 cartuchos. b) Flujo de aire a través del filtro de 12 cartuchos, a 20°C y con descarga a la atmósfera. *Pie cúbico de aire, a 1 atm y 20°C . Los cartuchos contienen 76 cm de longitud y 7.36 cm de diámetro, son de difusor de polivídnico, con poros de $22\text{ }\mu\text{m}$. (Cortesía de Millipore Corp.)

tibilidad de los microorganismos al calor. Otras correlaciones distintas a la de Arrhenius se utilizan, sobre todo en la industria de procesamiento de alimentos. Una relación de temperatura común para la resistencia térmica es el "tiempo de reducción decimal" (DRT), que se define como el tiempo requerido para reducir la población microbiana en un

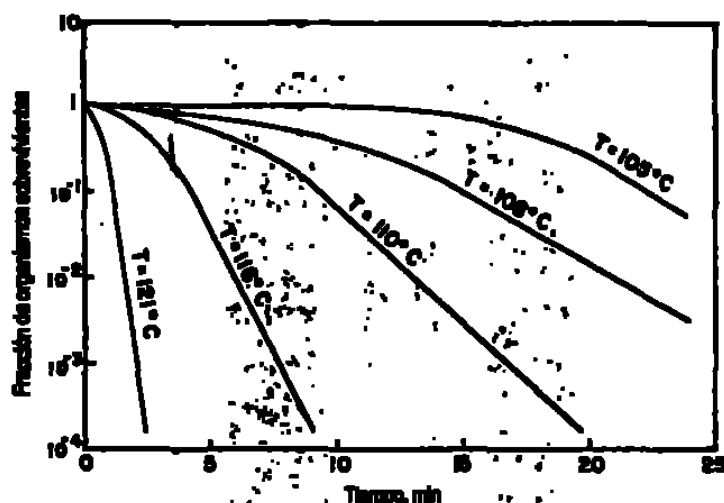


FIG. 27-80 Datos característicos de la mortalidad para las esporas de las bacterias (*B. stearothermophilus*). Para convertir °C a °F multiplíquese por 1.8 y añádase 32. (Wang et al. *Fermentation and Enzyme Technology*, Wiley-Interscience, New York, 1979, p. 140.)

TABLA 27-2 Resistencia relativa a la muerte con calor húmedo

Microorganismo	Resistencia relativa
Bacterias o levadura vegetal	1.0
Esporas de las bacterias	3 000 000
Esporas de moho	2-10
Virus y bacteriófagos	1-3

décimo. En intervalos cortos de temperatura [por ejemplo, 6°C (10°F)] el DRT es útil, pero su extrapolación a intervalos más amplios de temperatura produce errores graves.

En los caldos o licores de fermentación, la energía de activación (ΔE) relacionada con la muerte de los microbios es mayor que la inactivación térmica producida por los compuestos químicos (véase la tabla 27-3). Por consiguiente, se reduce al mínimo la sobrecoCCIÓN de los nutrientes debida a la esterilización a altas temperaturas durante periodos cortos (HTST).

TABLA 27-3 Energías de activación para la destrucción térmica

	Energía de activación, cal/mol*
Ácido fólico	26 800
Alcohol δ -pentoténico	21 000
Cianocobalamina	23 100
Hidrócloruro de timina	22 000
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	67 700
<i>Bacillus subtilis</i>	76 000
<i>Clostridium botulinum</i>	82 000
Putrefacción anaerobia NCB 3679	72 400

* Para convertir calorías por mol a Btu/lb mol, multiplíquese por 1.8.

Esterilización intermitente Si se supone que la presencia de un solo organismo contaminante puede ser la causa de la falla final de la fermentación deseada, es necesario asignar cierta probabilidad de éxito. Por ejemplo, si se puede tolerar una fermentación contaminada en la relación 1:1000, en el cálculo de diseño para el ciclo de esterilización debe utilizarse un valor de 0.001 organismos por fermentación. Sin embargo, en la esterilización por lotes o intermitente, las etapas de calentamiento, retención y enfriamiento del ciclo contribuyen a la reducción de los contaminantes microbianos. Además, la constante de velocidad de mortandad específica varía porque la temperatura del medio cambia. Por consiguiente, en los criterios de diseño, V total está compuesta por

$$V_{\text{total}} = V_{\text{por calentamiento}} + V_{\text{por retención}} + V_{\text{por enfriamiento}}$$

$$V_{\text{por calentamiento}} = \ln \frac{N_0}{N_1} = A \int_0^{t_1} \exp(-\Delta E/RT) dt \quad (27-8)$$

$$V_{\text{por retención}} = \ln \frac{N_1}{N_2} = A \int_0^{t_2} \exp(-\Delta E/RT) dt \quad (27-9)$$

$$V_{\text{por enfriamiento}} = \ln \frac{N_2}{N} = A \int_0^{t_3} \exp(-\Delta E/RT) dt \quad (27-10)$$

donde V representa la contribución incremental a la mortandad para cada fase de la esterilización, N_0 , N_1 , etc., son el número de organismos, T es la temperatura absoluta, R es la constante del gas, A es una constante empírica y E es la energía de activación.

Otros parámetros que afectan el perfil de temperatura incluyen: la viscosidad del medio y la cantidad de sólidos en suspensión o materiales insolubles, como, por ejemplo, los aceites vegetales. La velocidad de transferencia de calor depende de los coeficientes de transferencia de calor y los coeficientes de película. El ensuciamiento puede ser importante en la transferencia de calor. El perfil temperatura-tiempo durante la etapa de enfriamiento del ciclo de esterilización incluye los efectos producidos por los serpentines de enfriamiento o la chaqueta del fermentador y el enfriamiento por evaporación, si se inyecta aire estéril para la eliminación de calor. La liberación parcial de la presión da por resultado un enfriamiento por evaporación instantánea. La mayor parte de la esterilización se obtiene de la porción o etapa de retención del ciclo. El ciclo de enfriamiento contribuye poco al proceso general. Debe evitarse un ciclo de calentamiento extremadamente largo, porque su contribución a la destrucción de los microbios es menor que sus efectos perjudiciales.

Esterilización continua La esterilización continua permite tiempos de retención cortos a alta temperatura para evitar la sobrecoCCIÓN y puede mejorar el rendimiento. Para la esterilización continua se utilizan intercambiadores de calor tubulares o de marco y placa en lugar de la inyección de vapor. A pesar de que el calentamiento es casi instantáneo, la inyección de vapor produce un ruido violento y ofrece pocas oportunidades para el intercambio económico de calor entre las corrientes del proceso.

En la sección o etapa de retención de un esterilizador continuo deben mantenerse la temperatura y el tiempo de exposición correctos. Dada la distribución de los tiempos de residencia, la reducción real de los contaminantes microbianos en la sección de retención es mucho menor que la predicha en la suposición de flujo tipo tapón. La diferencia entre la reducción real de microorganismos y la predicha puede ser de varios órdenes de magnitud; por lo tanto, puede ser incorrecto un diseño basado en las condiciones ideales de flujo.

RECUPERACIÓN DEL PRODUCTO

La recuperación de los productos puede ser más difícil y costosa que la etapa de fermentación. Por ejemplo, en una planta para la producción de un antibiótico, la inversión en las instalaciones de recuperación fue aproximadamente cuatro veces mayor que la re-

querida para los recipientes de fermentación y su equipo auxiliar. Casi el 60% de los costos fijos de las plantas de fermentación para la producción de ácidos orgánicos o aminoácidos es para la sección de recuperación. En las fábricas grandes, la mayor parte del equipo

de purificación es el mismo que se utiliza en las industrias de procesos químicos.

Ciertos productos se encuentran contenidos dentro de las células y no se liberan, o sólo se liberan en forma parcial al medio. Puede que sea necesario lavar las células para eliminar las impurezas antes de romperlas para obtener el producto. La ruptura de la célula es una operación unitaria específica de la ingeniería bioquímica; sin embargo, el equipo puede utilizarse en otras industrias. Los molinos de coloides y los dispositivos de esfuerzo cortante como, por ejemplo, el homogenizador Mantou-Caulin, que se emplea para la fabricación de pinturas y otros productos, rompen las paredes de muchos tipos de células en formas eficaces. Las células con alta resistencia al esfuerzo cortante se pueden pasar varias veces, pero la generación de calor podría ser un problema. Por lo general, se utiliza energía ultrasónica para la desintegración a pequeña escala de las células, pero es poco práctica para corrientes grandes. La molienda con arena o cuentas, el bombeo a alta presión a través de un orificio pequeño, el congelamiento a alta presión a través de un orificio pequeño, el congelamiento y el deshielo, la desecación, la adición de enzimas líticas, la autólisis inducida con algún producto químico como por ejemplo, el cloroformo, y varios métodos para crear esfuerzos cortantes son opciones o medios sinérgicos para romper las células. Se obtienen resultados favorables con los mutantes especiales de las células, que tienen una capacidad superior para formar paredes celulares, a temperaturas ligeramente superiores a las del desarrollo normal. Cuando las células se cambian a la temperatura elevada, la división de la célula daña las paredes y deja que el contenido escape.

A pesar de que en ocasiones es posible proceder directamente al intercambio iónico, se utiliza la extracción con disolvente u otro procedimiento con todo el licor, para la eliminación de las células biológicas y otros sólidos. La centrifugación se puede tener en cuenta, pero generalmente se utilizan filtros de tambor rotatorio con cordones de descarga. En el pasado se utilizaban grandes cantidades de ayuda-filtro, porque muchos licores de fermentación son pegajosos y difíciles de filtrar, pero en la actualidad se emplean agentes poliméricos de puenteo para aglomerar los sólidos; esto permite una buena filtración con pequeñas cantidades de ayuda-filtro.

El intercambio iónico o la extracción con disolvente es deseable para la recuperación de los bioprocesos, porque la selectividad es buena, los costos son razonables y es factible a gran escala. Estos y otros pasos de purificación pueden verse afectados por las modificaciones en la fermentación. Por ejemplo, la adición de un exceso de lípidos o aceites antiespumantes puede agravar los problemas de emulsión para la extracción con disolventes o perjudicar el intercambio iónico por el recubrimiento de la resina. La estabilidad de los productos bioquímicos puede ser difícil. El licor o caldo de fermentación de la penicilina se acidifica justo antes de entrar en contacto con el disolvente de extracción (se emplean, por lo general, ésteres, cetonas o hidrocarburos halogenados), porque un pH bajo causa la destrucción rápida de la penicilina en agua. La penicilina se vuelve a extraer hacia la fase acuosa, a un pH que varía entre 7.5 y 8. Se utiliza bicarbonato para amortiguar el pH, porque los agentes ácidos son difíciles de controlar. El diseño Podbielski de una centrifuga (véase la Secc. 21) se utiliza mucho en

Estados Unidos para la extracción de licores de fermentación, en tanto que el diseño Westphalia es común en Europa. Puede haber operaciones de cabeza y cola, en las centrifugas, para mejorar los rendimientos porque las emulsiones dan por resultado menos etapas teóricas que las predichas por los fabricantes. La retroextracción en agua no presenta problemas de emulsión y los separadores Delaval dan buenos resultados.

De los varios tipos de etapas de purificación, basados en los procesos de sorción a una fase sólida, el intercambio de iones es el más directo (véase la Secc. 19 para el análisis de las técnicas). La adsorción con carbono tiene gran importancia para la ingeniería bioquímica, básicamente para la eliminación de huellas de impurezas coloreadas. Sin embargo, la adsorción del material deseado en carbono puede ser la menos mala de las técnicas cuando no se puede usar la extracción con disolvente ni el intercambio iónico. A pesar de que la adsorción en carbono no es selectiva y tiene baja capacidad, puede proporcionar una etapa de "aproximación" para iniciar el proceso de purificación.

Los procedimientos de aislamiento para muchos productos bioquímicos se basan en la cromatografía. Prácticamente cualquier sustancia puede ser elegida de una mezcla cruda y extraída, con una pureza relativamente elevada, mediante una columna cromatográfica, con la combinación adecuada de adsorbente, condiciones y reactivos. A pequeña escala o para una planta piloto pequeña, la cromatografía es un procedimiento opcional respecto a técnicas como la electroforesis, que en la actualidad es prácticamente obsoleta. Desafortunadamente, a medida que se incrementa el tamaño, la dispersión en la columna arruina la resolución. Para producir unos cuantos gramos o incluso kilogramos de producto, la cromatografía es una selección excelente. Cuando se resuelve el problema de escalamiento, este procedimiento revolucionará la purificación de los productos bioquímicos y con seguridad encontrará otras aplicaciones en las industrias de procesos químicos. Las perspectivas para el escalamiento son buenas, considerando que recientemente ha sido posible incrementar en un orden de magnitud las cargas de la columna.

La cromatografía por afinidad utiliza ligantes altamente específicos para ciertos compuestos. Existen varios tipos de afinidad que se pueden utilizar: antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato, enzima-cofactor o interacciones bioquímicas especiales como, por ejemplo, la avidina de las proteínas por la vitamina biotina. Se han ideado varios procesos de purificación que utilizan la cromatografía por afinidad para aislar productos bastante puros de una mezcla muy cruda. Los agentes de afinidad costosos se regeneran y reutilizan varias veces. En algunos casos, la afinidad es tan fuerte que el adsorbente puede agregarse por lotes. Esto se puede escalar adecuadamente, pero agrega pasos laboriosos para la recolección, elución y regeneración del agente de afinidad.

La cristalización es el método preferido para la obtención del producto final, porque se puede lograr una purificación muy alta. Se pueden producir cristales de antibióticos de gran pureza a partir de soluciones coloreadas bastante impuras si la torta es uniforme y se puede sujetar a un buen lavado, para eliminar el licor madre. Cuando se desea obtener un producto farmacéutico estéril, los cristales se producen a partir de las corrientes de líquido que se han esterilizado por filtración.

MODELADO DEL PROCESO

Por lo general, se supone que las propiedades de gran número de células se pueden considerar como funciones continuas con propiedades promedio, porque ocurren tantas divisiones de las células que las velocidades globales siguen curvas uniformes. Existen excepciones en las que puede indicarse la división de todas las células al mismo tiempo, porque sucesos como los cambios de temperatura o iluminación hacen más lenta o más rápida la etapa de división. Las células se pueden obligar a proceder juntas desde ese punto, con números globales que

están escalonados con el tiempo, lo que se conoce como "cultivo sincrónico". Las etapas rara vez son distintas para más de unas cuantas generaciones, a menos que el suceso de provocación se continúe aplicando en forma periódica.

Los balances de masa para los cultivos por lotes, corrientes y no sincronizados dan

$$dX/dt = \mu X - K_d X \quad (27-11)$$

$$dS/dt = -\mu X/Y \quad (27-12)$$

$$\mu = f(S) \quad (27-13)$$

donde k_d representa el coeficiente de mortalidad, μ , es el coeficiente específico de velocidad de crecimiento, S es la concentración del sustrato y los demás términos se definieron con anterioridad.

Se han propuesto varias relaciones funcionales entre S y μ , pero la ecuación de Monod es la que se utiliza casi en forma exclusiva:

$$\mu = \beta S/(K_s + S) \quad (27-14)$$

donde β es el coeficiente específico de la velocidad de crecimiento máximo y K_s es el coeficiente de Monod.

Por lo general, el coeficiente de mortalidad es relativamente pequeño, a menos que se acumulen sustancias inhibidoras; por consiguiente, la ecuación (27-14) muestra un incremento exponencial, hasta que S se agota, para reducir a μ . Esto explica la curva normal de crecimiento (Fig. 27-21), con su fase de retraso, la logarítmica, la de descenso y la de declinación, a medida que el efecto de K_s predomina.

Modelos estructurados. Existen varias maneras de agregar detalles significativos a los modelos de cultivos. Las células se pueden compartimentalizar de acuerdo con las funciones bioquímicas, y los componentes pueden interactuar. Por ejemplo, puede haber un grupo de ecuaciones para el metabolismo de los carbohidratos, otro para la síntesis de las proteínas, uno más para la síntesis del ácido nucleico, etc. Esto permite tener una descripción más intrincada de las actividades celulares, pero a expensas de contar con tantas constantes de velocidad que el asignarles valores puede terminar esencialmente como una adivinanza. Para las células con distintos ciclos de vida, el modelo estructurado puede tener compartimientos que corresponden a cada etapa del ciclo. Además, cada compartimiento puede subdividirse en las funciones bioquímicas antes mencionadas. Estos modelos tan complicados han tenido un uso práctico limitado, pero son muy valiosos para dirigir la investigación hacia las áreas donde falta información.

Cultivos continuos. Durante varias décadas, los cultivos continuos han sido la meta de los bioprogramas, porque los cultivos intermitentes tienen un tiempo muerto inherente, para limpieza y esterilización, y un prolongado retraso antes de que los organismos entren a un breve periodo de productividad elevada. Las corridas continuas pueden durar muchas semanas, pero debe haber paros para limpieza y mantenimiento. La nutrición y el manejo del producto pueden manipularse con ventaja en función de la velocidad de dilución. Sin embargo, un problema grave es la inestabilidad del cultivo en sí. El principal éxito de la fermentación continua se ha logrado con cepas re-

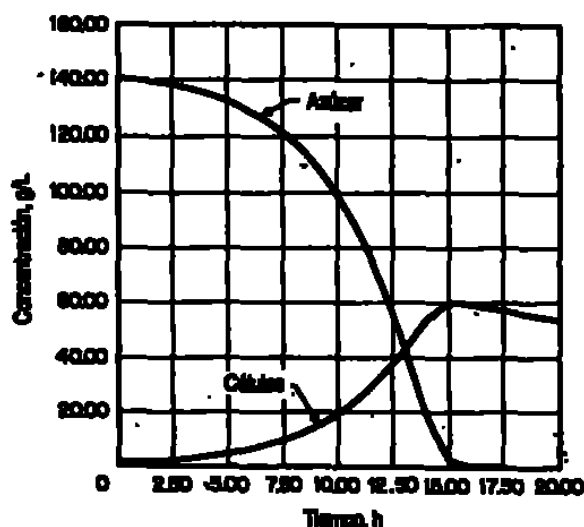


FIG. 27-21 Curva de crecimiento microbiano. $dx/dt = \mu X - K_d X$; $ds/dt = -\mu X/Y$; $\mu = \beta S/(K_s + S)$; $\beta = 0.25$; $K_d = 0.025$; $K_s = 12.0$; $Y = 0.48$.

sistentes que producen masa celular para la alimentación del ganado o una enzima simple o metabolito. Cuando se utiliza una sola etapa es difícil elevar al máximo el crecimiento de la célula, la producción de producto y la buena utilización de los sustratos. Se han utilizado ambos para las fermentaciones de antibióticos, que son muy sucios y forman recubrimientos voluminosos sobre el eje, los serpentines y cualquier tipo de protuberancia dentro del fermentador. A pesar de que esto puede limitar la longitud de la corrida, un problema más importante es el genético, porque existe una tendencia a retroceder hacia cultivos menos productivos que reemplazan rápidamente los mutantes finamente ajustados, los cuales logran altas concentraciones del producto.

En vista de lo limitado de las aplicaciones industriales, el cultivo continuo recibe lo que puede considerarse como una cantidad desproporcionada de atención por parte de los académicos. Como herramienta de investigación, el cultivo por lotes presenta cambios en las concentraciones de productos y reactivos, variaciones de pH y del potencial de oxidación-reducción, y una mezcla complicada de células en desarrollo, que se están muriendo y muertas. Los datos de los cultivos continuos son más fáciles de interpretar, porque se logran regímenes permanentes o existen desviaciones repetidas del régimen permanente. Las explicaciones comunes que se dan para el empleo limitado de los cultivos continuos en la industria son la inestabilidad del cultivo, la dificultad que existe para mantener condiciones asepticas, un conocimiento insuficiente sobre el comportamiento de los microbios y la resistencia para convertir las fábricas existentes. Otra razón más sutil es el costo de cada estación de investigación. Un progreso rápido en la investigación y desarrollo requiere recipientes múltiples para variar las diferentes variables; mas por lo general, sólo existen uno o dos fermentadores continuos, porque el costo de las bombas, depósitos, esterilizadores y controles es relativamente elevado.

Los medios convencionales para los cultivos continuos son el quemostat, en el que los nutrientes se alimentan a un reactor, a velocidad constante; y el turbidostat, que utiliza un control de retroalimentación de la velocidad de bombeo para mantener una turbiedad fija en el cultivo. Otra opción con control de retroalimentación del nutriente o de la concentración del producto se conoce con el nombre de "cultivo continuo de concentración acoplada controlada" o "CC". Es deseable un control proporcional de la velocidad de bombeo, porque los cultivos continuos pueden tener respuestas variables inducidas por el encendido y apagado de la bomba de alimentación.

Análisis matemático. El concepto del nutriente limitante es esencial para la teoría del cultivo continuo. Existirá un balance estequiométrico exacto de todos los ingredientes que entran a la célula sólo cuando se haga un esfuerzo deliberado, que consume tiempo, para determinar los detalles de nutrición de la célula. Aun así, puede obtenerse un balance diferente si se cambia la velocidad de crecimiento, o si se aplican limitaciones crónicas en vez de estequiométricas. La menor alimentación de un ingrediente en relación con los demás dará como resultado un crecimiento celular o una síntesis del producto limitados, porque se consumirá primero. Los otros ingredientes pueden ser tóxicos o afectar las actividades celulares, pero no existe una escasez aguda, como es el caso con el nutriente limitante.

Los balances de masa para el recipiente n de una serie de fermentadores continuos son

$$\text{Velocidad de cambio} = \text{velocidad de entrada} - \text{velocidad de salida} + \text{velocidad de producción} \quad (27-15)$$

$$V dX_n/dt = FX_{n-1} - FX_n + V\mu_n X_n$$

donde V es el volumen del fermentador, F es la velocidad de alimentación y los otros términos se definieron con anterioridad. El subíndice n se refiere al número del recipiente de fermentación.

Al dividir entre V y sustituir $D = F/V$

$$dX_n/dt = D(X_{n-1} - X_n) + \mu_n X_n \quad (27-16)$$

$$\text{y } V dS_n/dt = FS_{n-1} - FS_n - V\mu_n X_n/Y - VMX_n \quad (27-17)$$

$$dS_n/dt = D(S_{n-1} - S_n) - \mu_n X_n/Y - MX_n \quad (27-18)$$

donde M = coeficiente para la energía de mantenimiento (metabolismo sin crecimiento). Para un solo recipiente con alimentación estéril, esto se reduce a

$$dX/dt = \mu X - D X \quad (27-19)$$

$$dS/dt = D(S_0 - S) - \mu X/Y - M X \quad (27-20)$$

Este análisis se aplica a cualquier cultivo continuo que cubra las suposiciones de un mezclador perfecto y volumen constante. Las ecuaciones son fundamentales, salvo para la ecuación de Monod [Ec. (27-14)] que no depende del tiempo y debe aplicarse con cuidado a los estados transitorios, en los que puede haber un retraso de tiempo, a medida que μ responde al cambio de S . A régimen permanente, las velocidades de cambio son iguales a cero y $\mu = D$. Al sustituir

$$D = \mu S/(K_s + S) \quad (27-21)$$

$$S = D K_s/(\mu - D) \quad (27-22)$$

donde β es la constante específica de velocidad de crecimiento máximo. Al despejar X se obtiene

$$X = D Y (S - S_0)/(D + M Y) = Y (S_0 - S) \quad (27-23)$$

A partir de estas ecuaciones, puede graficarse el comportamiento de X y S en función de la velocidad de dilución (véase la Fig. 27-22). Los aspectos interesantes son que 1) X tiende a cero y S llega a S_0 cuando D se aproxima a β ; 2) S no es una función de S_0 cuando D es menor que β ; y 3) el coeficiente de mantenimiento es muy importante, pero sólo a bajas velocidades de dilución.

Se ha demostrado que el mezclador es básico a bajas velocidades de dilución, porque la toma del sustrato es extremadamente rápida por las células que se encuentran en condiciones de inanición. En los recipientes pequeños se requiere agitación muy vigorosa, para asegurar la distribución homogénea de la alimentación. Dicha agitación intensa es, probablemente, poco práctica para recipientes grandes, pero quizá sea posible distribuir la alimentación a través de muchas aberturas pequeñas en todo el tanque.

Es fácil proponer ventajas para el cultivo continuo en etapas múltiples, pero es muy difícil realizar toda la investigación y desarrollo de todos los parámetros que deben optimizarse. Cada etapa puede tener su corriente de alimentación, su control de pH y demás condiciones, junto con el reciclaje de las células o fluidos de las otras etapas del proceso. No sólo existen muchos parámetros a analizar para cada etapa sino, además, los cambios en una etapa pueden afectar considerablemente a las otras. Puede ser muy difícil obtener las condiciones y cultivos representativos en una etapa determinada para iniciar las investigaciones, por las complicadas interacciones con demás etapas. Los

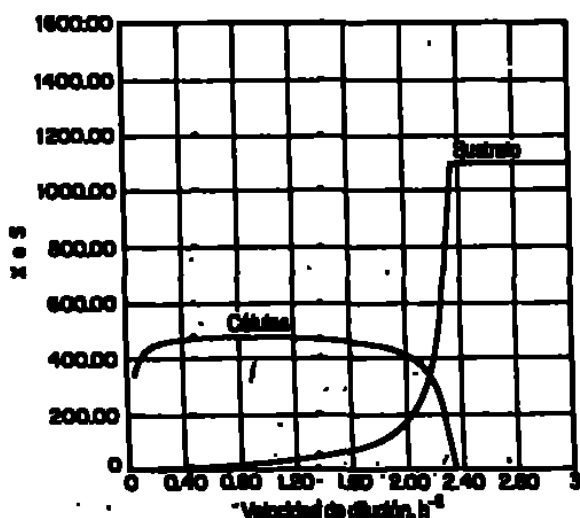


FIG. 27-22 Efectos de la velocidad de dilución en el cultivo continuo; $\beta = 2.38$; $S_0 = 1100$; $Y = 0.45$; $K_s = 25$; $E_M = 0.05$.

retrasos de tiempo en las líneas y separadores para reciclaje, además de la complejidad de los regímenes de flujo no ideal, causan análisis teóricos fallidos. Un sistema óptimo de fermentación continua en etapas múltiples con reciclaje y control es una de las proezas más difíciles de la ingeniería. Además, la dinámica de las respuestas de los microbios a las alteraciones no se conoce bien todavía.

Reciclaje La separación y recirculación de las células da por resultado tiempos de residencia más largos para las células que para el fluido y permite concentraciones relativamente elevadas de las células. En el tratamiento de desperdicios, la alimentación diluida produce velocidades más lentas de crecimiento. En consecuencia, se logra un procesamiento más rápido al obtener mayores poblaciones mediante la recirculación de las células, a pesar de que un porcentaje elevado de ellas pueden estar muertas, porque todas están en estado de inanición. Con la recirculación de las células se logran velocidades altas de producción, que también es importante en las fermentaciones industriales, y existen ventajas adicionales al reutilizar las células, en lugar de desviar los sustratos costosos para producir más células.

En los lodos activados, los organismos no asociados con flocúlos no son recolectados y tienden a abandonar el sistema conforme la recirculación incrementa las proporciones de los tipos floculantes. La recirculación de algas de interés comercial en estanques exteriores tiene profunda influencia sobre la población, pero los cambios de temporada pueden desarrollar algas pequeñas no obstante la retención de las algas grandes. Así, en este caso el reciclaje falla conforme las escasas algas grandes mueren o escapan en la recolección.

La recirculación de los fluidos de fermentación tiene objetivos muy diferentes a la recirculación de las células, que procura el control de la población o una mayor productividad. Ya que los licores agotados dejan nutrientes, el reciclaje puede ahorrar costos en los nutrientes y el agua de reposición, mientras que reduce considerablemente los volúmenes enviados al tratamiento de los desperdicios. Por supuesto, la recirculación total no es deseable porque se incrementa la concentración de los materiales indeseables y se puede envenenar la fermentación. Este incremento determina la cantidad de reciclaje, pero se pueden agregar etapas de purificación para eliminar las sustancias tóxicas. Por ejemplo, el ácido acético es un subproducto de la fermentación del alcohol, pero su baja volatilidad significa que la mayor parte está en el residuo (es decir, los fondos de la destilación del alcohol). Su eliminación por métodos físicos o químicos evita la acumulación en el fermentador debido al reciclaje. De otra manera, se metabolizaría mediante una cepa o especie especial o la marcha de cultivo.

En la figura 27-23 aparece un diagrama de cultivo continuo con recirculación. Los símbolos de las velocidades de flujo y las concentraciones de los organismos son F y X , respectivamente. Si se supone un mezclador perfecto y condiciones de régimen permanente, para que las derivadas se igualen a cero, los balances de masa dan por resultado

$$\mu = D \left[1 + \omega \left(1 - \frac{1 + \omega}{1 + \omega - \frac{F_s}{F}} \right) \right] \quad (27-24)$$

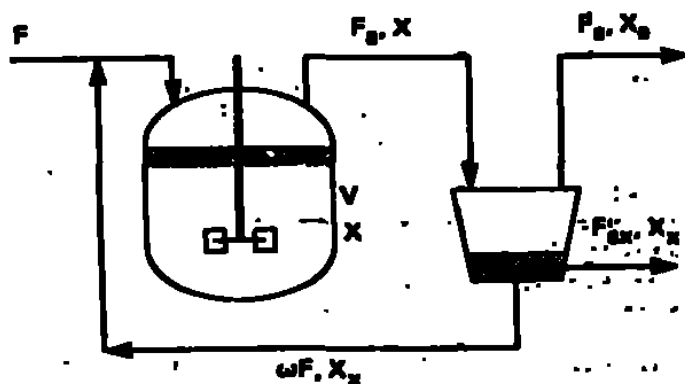


FIG. 27-23 Cultivo continuo con recirculación. (A. E. Humphrey, "Mechanical Engineering", en *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*, Vol. 4, julio 1977, pp. 359-394.)

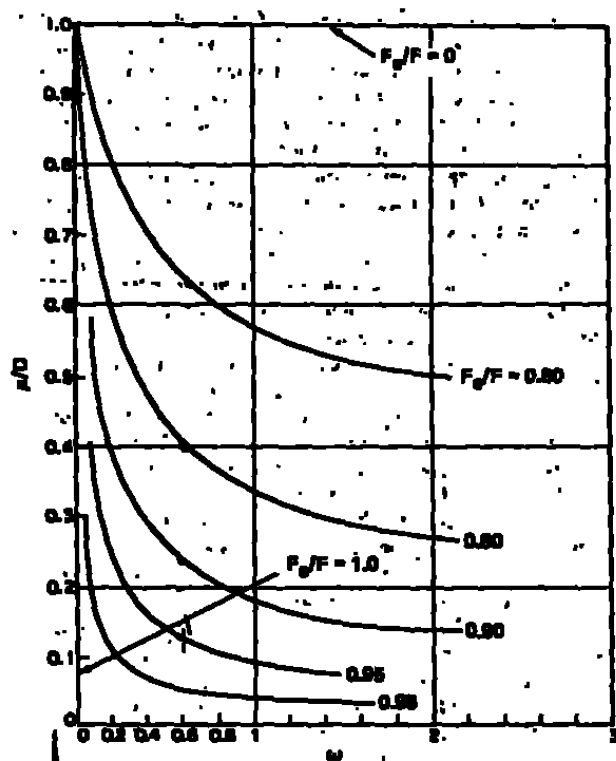


FIG. 27-24. Soluciones gráficas a la ecuación de recirculación. (A. E. Humphrey "Biochemical Engineering", en *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*, vol. 4, julio 1977, pp. 359-394.)

donde ω es la razón de recirculación, los términos F se muestran en la figura 27-23 y los otros términos se definieron antes.

Sin reciclaje, ocurre lisis cuando D es mayor que μ , pero la recirculación permite operar con valores de D bastante mayores que μ . Un conjunto de curvas, que aparece en la figura 27-24, para varias razones de sobreflujo F_0/F , relacionan μ/D con la razón de recirculación. Las curvas muestran que la concentración de la célula en la corriente de recirculación tiene mayor efecto cuando μ es pequeña, pero el efecto se nivela. Cuando $F_0/F = 0$, no hay recirculación y $\mu = D$.

Cultivos mixtos. Las mezclas de microorganismos caracterizan los procesos mostrados en la tabla 27-4. Los procesos para el tratamiento biológico de los desperdicios tienen cultivos selectivos y las proporciones de las diferentes especies pueden cambiar mucho en respuesta a cambios en la nutrición o a las condiciones fisiológicas. Existe un área interesante de investigación en determinadas mezclas de mi-

TABLA 27-4 Procesos de cultivos mixtos

Proceso	Tipos de organismos
Comercial	
Bebidas alcohólicas	Diferentes levaduras, mohos y bacterias
Cal agria	<i>L. Plantarum</i> con otras bacterias
Eucaridos	<i>L. Plantarum</i> con otras bacterias
Quesos	Propionibacterias, mohos y posiblemente muchos otros microorganismos
Ácido láctico	Das especies de <i>Lactobacillus</i>
Beta caroteno	Sesos especies de <i>Blastobotrys</i>
Tratamiento de desperdicios	
Filtros de espesamiento	Zoologos, protozoarios, algas y hongos
Sedimento activado	Zoologos, <i>Sphaerotilus</i> , levaduras, mohos y protozoarios
Digestión del sedimento	Bacterias celulolíticas y formadoras de ácido; bacterias metanogénicas
Lagunas para el drenaje	Muchos tipos de la mayor parte de las familias microbianas

TABLA 27-5 Definición de las interacciones microbianas

Competencia	Competencia por los nutrientes y el espacio
Depredación	Uno se come al otro
Comensalismo	Uno vive del otro, sin ayudarle ni dañarlo
Mutación	Ambos se benefician
Sinergismo	Combinación con metabolismo cooperativo
Antibiosis	Uno excreta un factor dañino para el otro

croorganismos, pero los resultados tienen poca aplicación práctica. En la tabla 27-5 aparecen las definiciones de las diferentes interacciones. Estas definiciones son difíciles de aplicar a sistemas reales en los que existen interacciones muy complejas entre los organismos, que desempeñan diferentes papeles entre sí.

Dos tipos de interacciones, la competencia y la depredación, son tan importantes que vale la pena estudiarlas para reducirlos a fórmulas matemáticas. Si se supone que los coeficientes de velocidad de crecimiento específico son diferentes, no se puede alcanzar el estado estacionario en un cultivo bien mezclado y continuo con organismos tipo A y B, porque si uno de ellos estuviera en régimen permanente con $\mu_A = D$, para el otro se tendría que μ_B es desigual a D , con lo que la velocidad de cambio no sería igual a cero. El resultado neto es el crecimiento rápido del tipo que predomina, mientras que el otro decae a cero. En los sistemas reales, incluso en aquellos que se aproximan a los cultivos continuos bien mezclados, puede haber cambios profundos en los números relativos de los diferentes organismos presentes, pero el total predominio de una sola especie es poco común. En los sistemas naturales, la sobrevivencia de gran número de especies es muy ventajosa, porque si se necesita que esté presente un tipo determinado, se agrega un nutriente poco común (μ contaminante 7) o se cambian las condiciones.

Los sistemas víctima-predador o de parásitos-huéspedes se pueden analizar a partir de las ecuaciones de balance de masa:

$$dH/dt = \mu_H H - D H \quad (27-25)$$

$$dP/dt = \mu_P P - D P \quad (27-26)$$

$$dS/dt = D(S_0 - S) - \mu_H H/Y \quad (27-27)$$

donde H = concentración de los huéspedes (víctima), P = concentración de los predadores, S = concentración del sustrato (alimento para las víctimas), S_0 = concentración de la corriente de alimentación, μ_H = función de Monod para S , y μ_P = función de Monod para H .

En la figura 27-25 aparece la simulación por computadora de estas ecuaciones. Los sistemas reales tienen este tipo de comportamiento oscilatorio, pero la frecuencia y las amplitudes son erráticas.

Otra interacción con graves consecuencias es el ataque a las especies que realiza una plaga (virus microbiano) que, por lo general, es altamente específica. La infección de una célula por una plaga virulenta da por resultado una producción que varía entre 10 y varios cientos de nuevas partículas de la plaga, cuyo ácido nucleico toma el control de las actividades celulares. Las células se desintegran y liberan a la plaga, que infecta a las otras células y alcanza rápidamente altas concen-

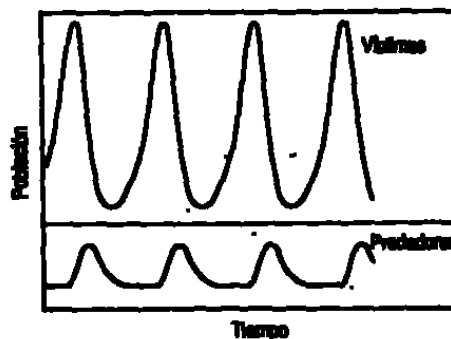


FIG. 27-25 Clásica víctima-predador.

53

traciones. Unas cuantas células de las especies huéspedes pueden ser resistentes a las plagas. Dicha resistencia puede adquirirse a través de la mutación. Estas células tienen pocos competidores y pueden sobrevivir. Sin embargo, también ocurren mutaciones en las plagas y, en consecuencia, ocurren comportamientos muy complicados a medida que los huéspedes sufren mutaciones, al igual que las plagas para contrarrestar la resistencia de los huéspedes.

Por lo general, los grupos de fermentaciones comerciales mantienen diferentes cepas de cultivos adecuados para la producción, de tal manera que los ataques de las plagas puedan frustrarse, al sustituirlos por un cultivo no susceptible. Después de cierto periodo, la plaga se disipa y se puede regresar a la cepa o especie de producción más deseable.

Computadoras e instrumentación Un fermentador es un aparato bastante complicado con controles de temperatura, velocidad de aeración, quizá pH, concentración de oxígeno disuelto o concentración de algunos nutrientes. Existe una tendencia muy acentuada hacia la recopilación y el análisis automatizado de datos. El control analógico todavía es muy común, pero cuando se dispone de una computadora para la recopilación de datos sobre la línea, a menudo es una buena práctica utilizarla también para el control.

Muchos de los problemas de los sensores como, por ejemplo, los que se presentan con los electrodos de pH esterilizados con vapor y las probetas de oxígeno disuelto han sido resueltos, pero aún existe la necesidad urgente de un método para medir en forma rápida y precisa la cantidad de material celular. Los métodos indirectos, por ejemplo, la medición de la proteína producida por las células o el monitoreo de los ácidos nucleicos, son válidos en ocasiones, pero se proporcionan en relación con la masa celular puede variar durante la fermentación. El desarrollo de modelos de computadora que puedan utilizarse para interpretar las variables medidas y calcular la masa celular o la

concentración del producto, que puede ser difícil o poco práctica de medir sobre la línea, ha sido un avance importante.

A pesar de que las respuestas dinámicas de los sistemas microbianos no se conocen bien todavía, los modelos con algunas características básicas y algunas empíricas se pueden correlacionar bastante bien con los datos reales. Las fermentaciones reales requieren varios días para terminar la corrida; pero muchas variables pueden probarse en unos cuantos minutos al utilizar la simulación por computadora. La optimización de las fermentaciones por medio de modelos y controles dinámicos de tiempo real aún están en los inicios. Sin embargo, las bases para dicho trabajo avanzan en forma constante. Los fundamentos para todos estos estudios son los balances precisos de materiales.

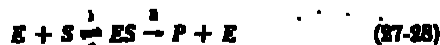
Los índices comunes del medio físico son la temperatura, la presión, el suministro de potencia al eje, la velocidad del impulsor, el nivel de la espuma, la velocidad de flujo de gas, las velocidades de alimentación del líquido, la viscosidad del licor, la turbiedad, el pH, el potencial de oxidación-reducción, el oxígeno disuelto y la concentración de los gases de salida. Se puede realizar gran variedad de ensayos químicos, pero son importantes el análisis de la concentración del producto, la concentración del nutriente y la concentración del producto precursor. Los índices de respiración se mencionaron antes en relación con la transferencia de oxígeno y son particularmente útiles en el control del comportamiento de la fermentación.

Los métodos de control por computadora se pueden orientar a la alta productividad, la elevada concentración del producto o la reducción al mínimo de los costos. Los sistemas de computadora pueden realizar una optimización sobre la línea de la fermentación. El progreso ha sido lento al utilizar los métodos empíricos, porque existen muchas variables y porque las técnicas estadísticas tienen una posibilidad de reproducción bastante baja para las fermentaciones.

CINÉTICA DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

Se considera que las enzimas son excelentes catalizadores por dos motivos: su alta especificidad y sus velocidades de renovación altas. Con algunas excepciones, todas las reacciones de los sistemas biológicos están catalizadas por enzimas y, por lo general, cada enzima cataliza una sola reacción. Para unas cuantas enzimas y otras proteínas, se han determinado las secuencias de aminoácidos y las estructuras tridimensionales. Como rara vez se conoce la estructura molecular de una enzima, no se dispone de un peso molecular preciso para medir la cantidad presente de enzima en gramos mol. En su lugar, casi siempre se expresa la cantidad en términos de su actividad catalítica. Se define la unidad internacional (IU) de enzima como la cantidad capaz de producir un micromol de producto de reacción en un minuto, en condiciones óptimas de reacción (o algunas definidas). La actividad específica es un índice de la pureza de la enzima.

A pesar de que los mecanismos pueden ser complejos y variados, a menudo, mediante algunas ecuaciones sencillas, se puede describir con bastante precisión la cinética de reacción de las reacciones enzimáticas comunes. Se considera que cada molécula de enzima tiene un sitio activo, que en primer lugar debe encontrar el sustrato (el reactivo) para formar un complejo, de tal forma que la enzima pueda funcionar. En consecuencia, se puede expresar el siguiente esquema de la reacción:



donde E = enzima, S = sustrato, ES = complejo enzima-sustrato y P = producto. Se puede suponer que las reacciones 1 y 2 están en equilibrio poco después de que la enzima ha sido expuesta a su sustrato. Entonces, la velocidad de formación del producto depende de la concentración del complejo enzima-sustrato de acuerdo con la ecuación

$$k_2 [ES] = k_1 [E][S] = k_1 [S] ([E]_T - [ES]) \quad (27-29)$$

$$V = d[P]/dt = k_2 [ES] \quad (27-30)$$

donde $[E]_T = [E] + [ES]$ = concentración del sustrato, $[ES]$ = concentración del complejo enzima-sustrato, $[P]$ = concentración del producto, t = tiempo y k_1, k_2, k_{-1} representan las constantes cinéticas. Esto da por resultado

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (27-31)$$

donde $K_M = k_{-1}/k_2$ es la constante de Michaelis. Esta ecuación describe con éxito el comportamiento clásico de un número sorprendentemente grande de reacciones de diferentes enzimas (véase la Fig. 27-26). Al obtener los recíprocos en ambos miembros se obtiene

$$1/V = (K_M/V_{max})/S + 1/V_{max} \quad (27-32)$$

Una gráfica lineal de $1/V$ en función de $1/S$ (la gráfica Lineweaver-Burk) permite la determinación de K_M y V_{max} a partir de los datos experimentales.

Esta derivación muestra cómo se maneja, por lo general, la cinética de las reacciones enzimáticas. El comportamiento cinético se complica cuando existen dos especies químicas las cuales pueden formar complejos con las moléculas de enzimas. Una de las especies puede comportarse como un inhibidor de la reacción enzimática y la otra como el sustrato. Dependiendo de la naturaleza de los complejos, los diferentes patrones de inhibición darán por resultado ecuaciones cinéticas distintas. Por ejemplo



54

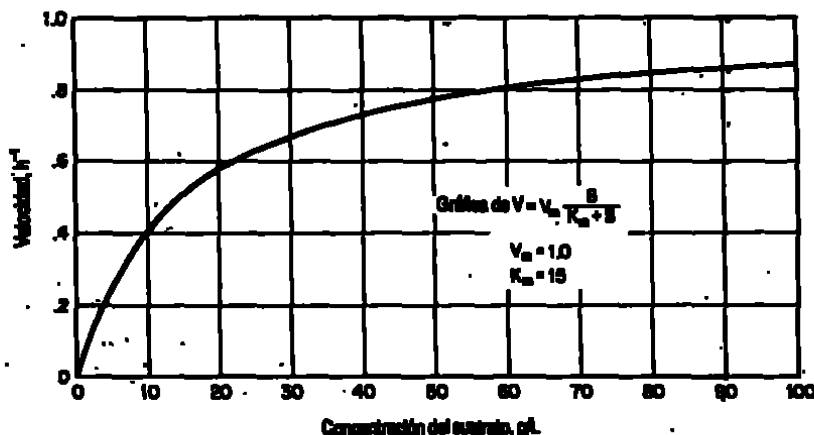


FIG. 27-28 Cinética de Michaelis-Menten. Para convertir gramos por litro a libras por pie cúbico, multiplíquese por 0.0624.

donde I = inhibidor.

Ya que el complejo EI no da por resultado el producto P y considerando que I compete con S por E , esto se conoce como una inhibición competitiva. Por analogía con la ecuación de Michaelis-Menten,

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad (27-35)$$

donde I = concentración del inhibidor competitivo y K_i es la constante de inhibición.

Las reacciones enzimáticas también son sensibles a los cambios de pH y de temperatura. En la caracterización de una enzima, el pH y la temperatura óptima son las condiciones en las que la enzima tiene su más elevada actividad catalítica.

Para una exposición más amplia sobre la cinética de las reacciones enzimáticas, consúltese los textos usuales de bioquímica y también, M. Dixon y E. C. Webb, *Enzymes*, 2a ed., Academic, New York, 1964, o I. H. Segal, *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975.

Ingeniería de la inmovilización de la enzima y la enzima inmovilizada. Un factor que por lo general impide el desarrollo de las aplicaciones industriales de las enzimas es su costo elevado. La inmovilización es una técnica para retener las moléculas de las enzimas con objeto de volverlas a utilizar. El método para la inmovilización puede ser por adsorción, enlace covalente o entrapamiento. Las membranas semipermeables con forma de láminas planas o fibras huecas son una manera de retener la enzima, ya que permiten el paso de las moléculas más pequeñas. Se han utilizado la gel de poliacrilamida y la de sílica, así como materiales similares, para entrapar biológicamente los materiales activos, incluyendo las enzimas. La encapsulación es otro medio de captura, al recubrir las gotas de líquido que contienen enzimas con algún material semipermeable, formado en el sitio. Hablando en general, el entrapamiento no incluye una reacción química o fisicoquímica directamente con las moléculas de las enzimas, y por consiguiente dichas moléculas no se alteran. La adsorción física en partículas de carbón activado y la adsorción iónica en resinas de intercambio de iones son importantes para la inmovilización de la enzima. Un método con gran número de posibles variaciones es el enlace covalente de la enzima con un portador seleccionado. Materiales como partículas de vidrio, celulosa, sílica, etc., se han utilizado como portadores para la inmovilización. Las enzimas inmovilizadas por entrapamiento y adsorción están sujetas a pérdidas por fugas y desorción, respectivamente. Por otra parte, el tratamiento químico para la formación del enlace covalente entre una enzima y su portador puede dañar en forma permanente algunas moléculas de enzimas. En la inmovilización de la enzima se utilizan a menudo dos términos de eficiencia. El "rendimiento de la inmovilización" se puede utilizar para describir el porcentaje de actividad de la enzima que se ha inmovilizado.

$$\text{Rendimiento porcentual} = 100 \times \text{actividad inmovilizada/actividad de iniciación}$$

Por otra parte, la "eficiencia de la inmovilización" describe al porcentaje de actividad de la enzima que se observó:

$$\text{Eficiencia porcentual} = 100 \times \text{actividad observada/actividad inmovilizada}$$

Cuando una molécula de enzima se une a un portador, su sitio activo puede bloquearse estéricamente y, por consiguiente, su actividad se vuelve inobservable (inactivada).

Uno de los parámetros más importantes de un complejo portador inmovilizado es la estabilidad de su actividad. La actividad catalítica del complejo disminuye con el tiempo, por las fugas, desorciones, desactivación y similares. A menudo se utiliza la vida media del complejo para describir la estabilidad de actividad. A pesar de que hay muchas excepciones frecuentes, el decaimiento lineal se suele suponer en el tratamiento de la cinética de decaimiento de la actividad de un complejo inmovilizado.

Con frecuencia, la inmovilización por adsorción o por enlace covalente ayuda a estabilizar la configuración molecular de una enzima contra las alteraciones, que incluyen las que pueden causar desactivación térmica. Las enzimas inmovilizadas tienden a ser menos sensibles a cambios de pH que las enzimas libres. La mayor parte de los portadores están diseñados para que tengan una alta porosidad y grandes áreas de superficie interna, con objeto de que cantidades relativamente grandes de enzimas se puedan inmovilizar en un volumen o peso determinado del portador. Por lo tanto, en un complejo portador de enzimas inmovilizadas, las moléculas de enzimas están sujetas al efecto del micromedio en los poros del complejo. Las cargas superficiales y otros efectos del micromedio pueden crear un cambio ascendente o descendente en el pH óptimo de actividad de la enzima.

Un complejo portador-enzima inmovilizada es un caso especial, para el cual se pueda utilizar la metodología desarrollada para la evaluación de un sistema catalítico heterogéneo. El complejo de la enzima también tiene efectos de difusión externa, efectos de difusión de poro y un factor de eficacia. Cuando se transportan en solución acuosa, la transferencia de calor es por lo general, buena y es posible suponer que prevalecen las condiciones isotérmicas para el complejo de enzima inmovilizada.

La ecuación de Michaelis-Menten y otras expresiones similares no lineales caracterizan la cinética de las enzimas inmovilizadas. Por consiguiente, para una partícula portadora porosa y esférica, con moléculas de enzimas inmovilizadas en sus superficies tanto interna como externa, el balance de materiales en el sustrato se por resultado lo siguiente:

$$\frac{1}{r} \frac{D_e}{dr} \frac{dS}{dr} + D_e \frac{d^2 S}{dr^2} = \frac{V_{max} S}{K_M + S} \quad (27-36)$$

con las condiciones límite usuales,

$$\text{con } r=R, S=S \quad \text{y} \quad \text{en } r=0, dS/dr=0$$

donde R = radio de la esfera, r = distancia al centro de la esfera, S = concentración del sustrato, D_e = difusividad real.

$$\frac{d^2 y}{dx^2} + \frac{2}{x} \frac{dy}{dx} - \phi^2 y \left(\frac{1}{\beta} + y \right) = 0 \quad (27-37)$$

donde y es una concentración adimensional, x es una distancia adimensional y ϕ y β son constantes adimensionales. Las condiciones límite son con $x=1, y=1$ y en $x=0, dy/dx=0$. El parámetro ϕ es el módulo de Thiele para el complejo enzima inmovilizado. Se dispone de soluciones gráficas en pruebas estándar. Dos condiciones asintóticas significativas tienen soluciones analíticas. En un extremo, $\beta \rightarrow 0$, lo que significa que $S \gg K_M$ y, en forma correspondiente, la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a una reacción de orden cero, con $V = V_{max}$. Esta es la condición de saturación; es decir, el suministro de sustrato es alto y satura todos los sitios activos de las moléculas de enzimas. En el otro extremo, $\beta \rightarrow \infty, K_M \gg S$ y, en forma correspondiente, la ecuación de Michaelis-Menten se aproxima a una reacción de primer orden, con $V = (V_{max} S/K_M)$. Esta es la condición de control completo del sustrato.

LECTURAS ADICIONALES: *Enzyme immobilization*, R. A. Mearns, *Immobilized Enzymes for Industrial Reactions*, Academic, New York, 1975. O. R. Zbozsky, *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1973. *Review of heterogeneous catalysis*, C. N. Satterfield, *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysis*, M.I.T., Cambridge, Mass., 1970. T. K. Sherwood, R. L. Pigford y C. R. Wilson, *Mass Transfer*, McGraw-Hill, New York, 1975.

Reactores enzimáticos Una enzima inmovilizada sobre cuentas de un material de soporte o capturada en una gota de gel es esencialmente una partícula catalítica. Cuando se coloca en una columna empacada, puede haber flujo ascendente o descendente de la solución de alimentación y es factible un lecho fluidificado, salvo que la cohesión de una partícula, a menudo, pone en peligro la estabilidad de la enzima. Un problema grave es el crecimiento de microorganismos sobre las partículas, porque las enzimas son proteínas nutritivas. Con frecuencia las enzimas inmovilizadas tienen más estabilidad térmica que las enzimas libres, de manera que las columnas se pueden operar a temperaturas elevadas, que varían entre 50 y 65°C (122 a 149°F), para mejorar la velocidad de reacción e inhibir gran parte, pero no la totalidad de los

organismos contaminantes. Las soluciones estériles de alimentación y las técnicas asépticas pueden reducir al mínimo la contaminación. Por lo general, se agregan antisépticos a la alimentación y, en ocasiones, se da un tratamiento con un producto químico tóxico, para lavar los organismos de la columna. En ocasiones, se agregan partículas con enzimas inmovilizadas a un reactor y después se recuperan por filtración o por un método físico como, por ejemplo, el empleo de imanes para recolectar las enzimas unidas al hierro.

La celulosa se hidroliza mediante un complejo de varias enzimas. La mezcla de actividades enzimáticas producida por cultivos de mohos puede tener cantidades insuficientes de la enzima beta glucosidasa, para mantener una velocidad de hidrólisis aceptable comercialmente. Esta enzima se puede producir con un cultivo de distintos microbios y utilizarlos como complemento de la mezcla original y enzimas; sin embargo, el costo es elevado. Es lógica la inmovilización de la enzima beta glucosidasa para usos múltiples. El manejo se reduce al mínimo mediante la circulación del fluido procedente del reactor principal a través de una columna externa empacada con enzimas inmovilizadas.

Los reactores que utilizan membranas para la retención de las enzimas pueden tener varias formas. Es posible agregar enzimas libres y recuperarlas por ultrafiltración; no obstante la necesidad de un área superficial suficiente de la membrana para obtener buenas velocidades de filtración y el equipo auxiliar necesario hacen que este método sea costoso. Un dispositivo hueco de fibra empaqa gran cantidad de superficie de membrana dentro de un volumen pequeño. La enzima se puede inmovilizar en el interior o el exterior de la fibra y es fácil de lavar y reemplazar la enzima. Las desventajas de este diseño son que 1) la estabilidad de la enzima no se mejora como en la inmovilización con productos químicos; 2) existen dos etapas de transferencia de masa, a medida que el sustrato se difunde a través de la fibra hasta llegar a la enzima y el producto se difunde al regreso, y 3) la difusión es escasa en el exterior de las fibras empacadas. Las resistencias difusionales se reducen al mínimo cuando la enzima se inmoviliza sobre o dentro de la membrana, lo que proporciona un excelente contacto a medida que la alimentación se fuerza a través de ella.

LECTURAS ADICIONALES: *Enzyme Engineering*, vol. 2, E. K. Fye y L. B. Wingard (eds.), 1974; vol. 3, E. K. Fye y H. H. Westall (eds.), 1978; vol. 4, G. B. Brown y G. Minacka (eds.), 1978; vol. 5, H. H. Westall y G. P. Royer (eds.), 1980, Plenum, New York. *Enzyme Engineering: Future Directions*, L. B. Wingard, I. V. Berezina y A. A. Klyosov (eds.), Plenum, New York, 1980. Y. Y. Lee y G. T. Tsao, "Engineering Problems of Immobilized Enzymes," *J. Food Technol.*, 30, 667 (1974).